

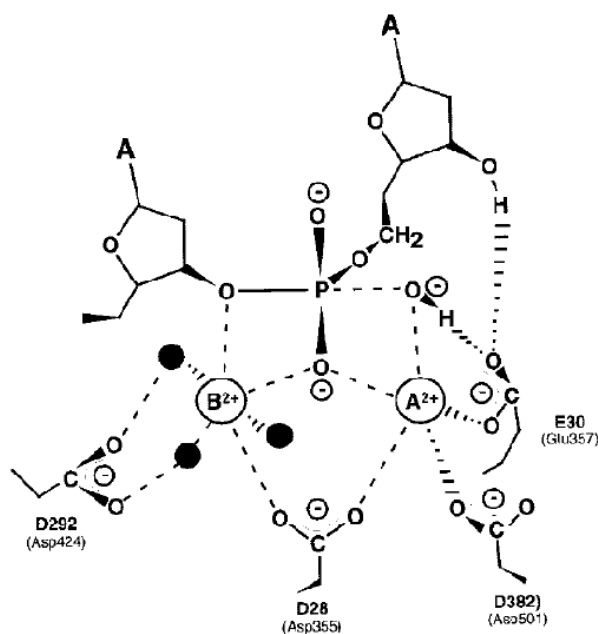


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

ΜΑΡΙΑ ΜΠΟΥΡΧΑ

Ρόλος της απαδευνύασης PARN στη βιοσύνθεση των miRNAs:
Μελέτη του μεταλλάγματος PARN E30A στα επίπεδα έκφρασης επιλεγμένων
miRNAs



ΛΑΡΙΣΑ 2016

**«Ρόλος της απαδενυλάσης PARN στη βιοσύνθεση των miRNAs:
Μελέτη του μεταλλάγματος PARN E30A στα επίπεδα έκφρασης επιλεγμένων
miRNAs»**

**«Role of deadenylase PARN in biosynthesis of miRNAs:
Study of mutant PARN E30A in expression levels of selected miRNAs»**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας – Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων η υποστήριξη και οι υποδείξεις υπήρξαν πολύτιμες για την διεκπεραίωση της παρούσης εργασίας. Όλα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Ν.Μπαλατσό, για την αμέριστη ηθική και επιστημονική συμπαράσταση και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας (Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας) Α.Κυρίτση για την σημαντική συμβολή του στη διεξαγωγή των πειραμάτων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1. Μη κωδικά μόρια RNA	10
microRNAs.....	11
Μηχανισμός της γονιδιακής σίγησης μέσω RNAi	11
Βιογένεση των miRNAs.....	14
Αποικοδόμηση των miRNAs.....	18
miRNAs και καρκίνος.....	19
miRNAs και διάγνωση του καρκίνου	24
miRNAs και διάγνωση του καρκίνου	25
miRNAs και πρόγνωση του καρκίνου	27
Τα miRNAs ως θεραπευτικοί στόχοι.....	27
1.2. Απαδενυλίωση	29
Απαδενυλίωση μέσω RNA- συνδεόμενων πρωτεϊνών	30
Απαδενυλίωση mRNA στόχων μέσω miRNAs.....	31
Απαδενυλάσες.....	32
Απαδενυλάσες και miRNAs στον καρκίνο	36
Η πολυ (A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση PARN.....	38
2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	44
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	45
3.1 Στοχευμένη μεταλλαξιγένεση	45
Σύνθεση της μεταλλαγμένης αλληλουχίας της PARN E30A	45
Πρωτόκολλο στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης.....	47
Χημικός μετασχηματισμός δεκτικών XL1-Blue κυττάρων (transformation)	48
Δημιουργία μικρών καλλιεργειών	48
Καθαρισμός πλασμιδίου.....	49
Αλληλούχιση του DNA πλασμιδίου	49
3.2. Κλωνοποίηση της PARN E30A.....	50
Πρωτόκολλο κατασκευής του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου	51
Δημιουργία μικρών καλλιεργειών	54
Καθαρισμός πλασμιδίου.....	54
Πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου με το ένζυμο περιορισμού EcoRI	54
3.3. Υπερέκφραση της PARN WT και PARN E30A σε κύτταρα θηλαστικών	55
Χειρισμός κυτταρικής σειράς	55

Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με χρήση λιποσωμάτων	57
Επαγωγίμο από τετρακυκλίνη σύστημα γονιδιακής έκφρασης.....	59
3.4. Απομόνωση ολικού RNA και πρωτεϊνών από κύτταρα θηλαστικών.....	63
3.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε δύο βήματα (Two step Real Time PCR)	65
3.6. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blotting)	71
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	76
4.1. Αλληλούχιση του DNA του μεταλλάγματος PARN E30A.....	76
4.2. Ηλεκτροφόρηση του DNA του μεταλλάγματος PARN E30A σε πηκτή αгарόζης.....	76
4.3. Ηλεκτροφόρηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pCDNA4/TO μετά από πέψη με το ένζυμο περιορισμού EcoRI	77
4.4. Έλεγχος της υπερέκφρασης της PARN WT και PARN E30A σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης	78
4.5. Έλεγχος των επιπέδων των pri-miRs (pri-miR-29a, pri-miR-1207) και miRs (miR-29a, miR-1207) μετά από υπερέκφραση της PARN WT και της PARN E30A .	82
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	90
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	95
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	110

Η σταθερότητα του mRNA είναι μια κρίσιμη παράμετρος, καθώς ρυθμίζει τα επίπεδα παραγωγής των πρωτεϊνών του κυττάρου. Η βράχυνση της πολυ (A) ουράς του mRNA καθορίζει την σταθερότητα του mRNA, καθώς είναι συνήθως το πρώτο και καθοριστικό βήμα στην αποικοδόμηση του mRNA. Η πορεία της βράχυνσης καταλύεται από μια κατηγορία εξειδικευμένων 3'-εξοριβονουκλεασών του κυττάρου, γνωστή ως απαδενυλάσες. Πρόσφατα, τα microRNAs (miRNAs) έχουν αναγνωριστεί ως σημαντικοί ρυθμιστές της γονδιακής έκφρασης και εμπλέκονται σε πλήθος διεργασιών του κυττάρου αλλά και του οργανισμού, ενώ απορρύθμιση της δράσης τους σχετίζεται με σοβαρές διαταραχές και νόσους. Τα miRNAs εκδηλώνουν τη δράση τους μέσω στόχευσης της συμπληρωματικής αλληλουχίας στην 3' αμετάφραστη περιοχή των mRNA – στόχων, η οποία προκαλεί την διακοπή της μετάφρασής τους και την προσέλκυση απαδενυλασών που ξεκινούν την αποικοδόμησή τους. Έτσι, η ενορχηστρωμένη δράση των microRNAs και των απαδενυλασών είναι κρίσιμη για τη γονδιακή έκφραση, ενώ διαφοροποίηση των επιπέδων των απαδενυλασών και των miRNAs, μπορεί να προκαλεί απορρύθμισή της. Το ενδιαφέρον στρέφεται στη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο αυτών παραγόντων, προκειμένου να προσδιοριστεί η συμβολή τους στον καρκίνο.

Μεταξύ των απαδενυλασών, η PARN είναι ίσως η καλύτερα μελετημένη. Πρόσφατα δεδομένα τη συνδέουν με αποικοδόμηση επιλεγμένων mRNAs μέσω microRNAs καθώς και τη βιοσύνθεση των microRNAs, ενώ τα επίπεδά της μεταβάλλονται σε μορφές καρκίνου. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση που μπορεί να έχει ένα καταλυτικά ανενεργό μετάλλαγμα της PARN, το PARN E30A, με τα πρόδρομα μόρια (pri-miR-29a, pri-miR-1207) και τα ώριμα miR-29a και miR-1207, σε σύγκριση με τη φυσιολογική μορφή της PARN. Για το σκοπό αυτό, αρχικά υπερεκφράστηκαν τόσο η φυσική PARN, όσο και η μεταλλαγμένη PARN E30A σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά από καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα (NCI-H520), με τη χρήση επαγωγίμιου από τετρακυκλίνη συστήματος γονιδιακής έκφρασης. Η υπερέκφραση της PARN WT και της PARN E30A ελέγχθηκε σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης με ποσοτική qRT-PCR και με ανοσοαποτύπωση, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, ακολούθησε η εξέταση των επιπέδων έκφρασης των pri-miRs (pri-miR-29a, pri-miR-1207) και miRs (miR-29a, miR-1207) στα εκχυλίσματα των παραπάνω κυττάρων με qRT-PCR. Από τα πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν, διαφαίνεται μια σαφής αλληλεπίδραση μεταξύ της απαδενυλάσης PARN και των επιλεγμένων miRNAs (miR-29a, miR-1207), υποδηλώνοντας ότι η PARN συμμετέχει

με κάποιο τρόπο στην ωρίμανσή τους, μέσω ρύθμισης των επιπέδων των πρόδρομων μορφών του (pri-miR μορφών).

ABSTRACT

The mRNA stability is a critical parameter, and regulates the production levels of cell proteins. The shortening of the poly (A) tail of mRNA determines the stability of the mRNA, since it is usually the first and crucial step in the degradation of the mRNA. The shortening is catalyzed by a class of specific 3'-exoribonucleases of cell, known as deadenylases. Recently, microRNAs (miRNAs) have been identified as important regulators of gene expression and involved in a number of cell and organization processes, and deregulation of their activity is associated with serious disorders and diseases. The miRNAs exhibit their action by targeting the complementary sequence in the 3' untranslated region of the mRNA - targets, which causes the interruption of the translation and attracts deadenylases, which start the degradation. Thus, the concerted action of microRNAs and deadenylases seems to be critical to gene expression and differentiation of deadenylases and miRNAs levels, can cause deregulation of gene expression. Attention turns to exploring the interaction between these two factors in order to determine their contribution to cancer.

Among deadenylases the PARN is probably the best studied. Recent evidence linking it with degradation of selected mRNAs by microRNAs, the biosynthesis of microRNAs, and its levels are altered in cancers. In this study, we investigated the interaction may have a catalytically inactive mutant of PARN, the PARN E30A, the precursors (pri-miR-29a, pri-miR-1207) and the mature miR-29a and miR-1207, compared to the native form PARN. For this purpose, initially both PARN WT and mutant PARN E30A were overexpressed in human carcinoma cell line squamous cell lung (NCI-H520), using a tetracycline inducible gene expression system. Overexpression of PARN WT and PARN E30A was controlled at the mRNA and protein level by quantitative RT-PCR and immunoblotting, respectively. Then, followed by examining the expression levels of pri-miRs (pri-miR-29a, pri-miR-1207) and miRs (miR-29a, miR-1207) in the extracts of these cells by qRT-PCR. From the experimental data obtained, it seems clear interactions between deadenylase PARN and the selected miRNAs (miR-29a, miR-1207), suggesting that PARN involves somehow in their maturity, by adjusting the levels of precursors (pri-miR forms).

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Μη κωδικά μόρια RNA

Το μεγαλύτερο μέρος του ανθρώπινου γονιδιώματος (98%) δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνες και αποτελείται είτε από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, ή από μοναδιαίες αλληλουχίες ανάμεσα στα γονίδια (αποτελούν το 75% του γονιδιώματος), καθώς και από τα ιντρόνια (αποτελούν το 23% του γονιδιώματος) (Lewin, Genes VIII). Ένα μικρό ποσοστό του ανθρώπινου γονιδιώματος μεταγράφεται σε λειτουργικά μη-κωδικά μόρια RNA (non-protein-coding RNAs, ncRNAs) (Mattick J.S. 2009).

Ο ρόλος των μη-κωδικών μορίων RNA επεκτείνεται από τη συμμετοχή τους στη βιοσύνθεση πρωτεϊνών (rRNA και tRNA), και την ικανότητα κατάλυσης βιοχημικών αντιδράσεων, όπως είναι η τμήση και η σύνδεση RNA μορίων και ο σχηματισμός πεπτιδικών δεσμών (ribozymes) (Nissen et al., 2000), σε περισσότερο ρυθμιστικούς ρόλους. Η ανακάλυψη του μηχανισμού παρεμβολής του RNA (RNA interference, RNAi) αποκάλυψε ότι εξειδικευμένα μη-κωδικά μόρια RNA αποτελούν κύριους μετα-μεταγραφικούς ρυθμιστικούς παράγοντες της γονιδιακής έκφρασης.

Τα μη κωδικά μόρια RNA αποτελούνται από δύο τάξεις μορίων α) μία τάξη μικρών μορίων RNA (μήκους ~20-30 nt) και β) μία τάξη μεγάλων σε μέγεθος μη-κωδικών RNAs (long non-coding RNAs, lncRNAs) με μήκος >200nt, τα οποία ανακαλύφθηκαν προσφάτως. Τα lncRNAs αποτελούν ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης, με την εμπλοκή τους στη μεταγραφή, στο μάτισμα, στη μετάφραση αλλά και σε άλλες διεργασίες (Guttman et al. 2009, Mattick J.S. 2009, Ponting et al. 2009, Wilusz et al. 2009).

Η τάξη των μικρών RNAs (small RNAs) αποτελείται από 3 βασικές κατηγορίες: τα microRNAs (miRNAs), τα short interfering RNAs (siRNAs) και τα piwi-interacting RNAs (pi-RNAs) (Carthew and Sontheimer, 2009). Τα RNAs αυτά υπάρχουν μόνο στους ευκαρυώτες (Carthew and Sontheimer, 2009). Τα siRNAs και τα miRNAs φυλογενετικά είναι τα πιο διαδεδομένα μικρά RNAs, και χαρακτηρίζονται από τη φύση των δίκλωνων πρόδρομων μορίων τους (Carthew and Sontheimer, 2009). Αντίθετα, τα pi-RNAs έχουν αρχικά βρεθεί μόνο στο βασίλειο των ζώων, όπου φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στη γαμετογένεση, και προέρχονται από μονόκλωνα πρόδρομα μόρια (Carthew and Sontheimer, 2009).

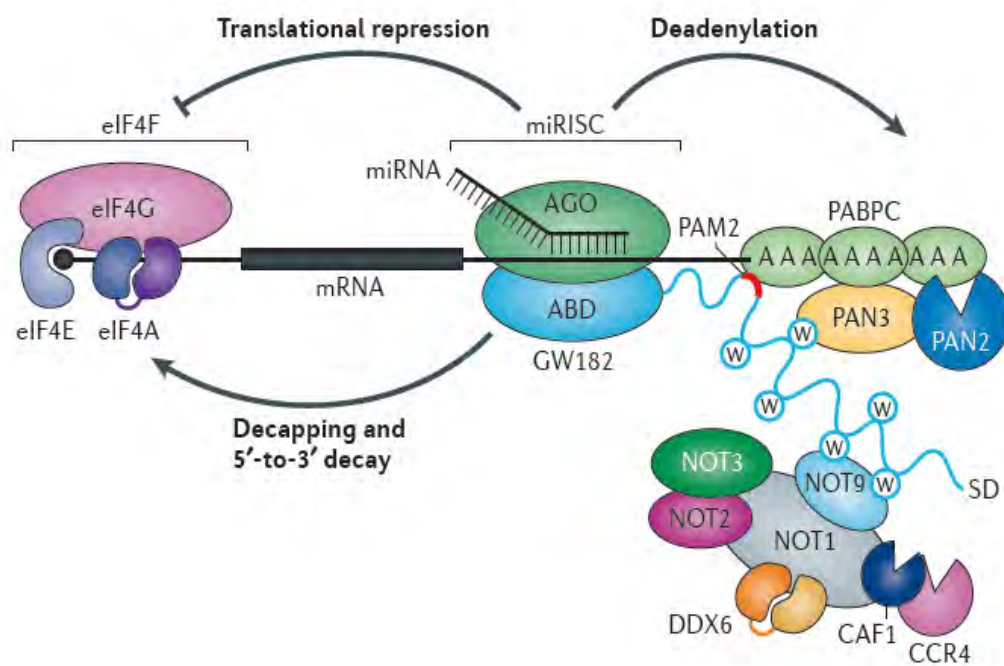
microRNAs

Τα microRNAs (miRNAs) είναι μικρά μη κωδικά RNAs μήκους ~21 νουκλεοτιδίων, τα οποία αποτελούν μετα-μεταγραφικό ρυθμιστή της γονιδιακής έκφρασης στα μετázωα και στα φυτά (Krol et al, 2010). Τα miRNAs έχουν μελετηθεί εκτενώς, λόγω της εμπλοκής τους σε βιολογικά μονοπάτια και σε ασθένειες. Εμπλέκονται σε μια ποικιλία φυσιολογικών βιολογικών διεργασιών, οι οποίες περιλαμβάνουν την απόπτωση, την αιμοποίηση, την ανάπτυξη και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η έκφραση τους είναι ειδική για συγκεκριμένους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια και το προφίλ τους αλλάζει σε διάφορες ανθρώπινες ασθένειες (Ambros et al., 2003). Στα θηλαστικά, τα miRNAs ελέγχουν την ενεργότητα του 50% των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Η συσχέτιση των miRNAs με τον καρκίνο έχει αποδοθεί λόγω του εντοπισμού των αλληλουχιών που μεταγράφονται σε miRNAs, σε γενωμικές περιοχές που εμπλέκονται στην δημιουργία του καρκίνου, καθώς και του απορρυθμισμένου προτύπου έκφρασής τους σε κακοήθειες (Calin et al., 2004a; Calin et al., 2004b). Για τους λόγους αυτούς, τα miRNAs αναδύονται ως δυνητικά σημαντικοί προγνωστικοί και διαγνωστικοί δείκτες με μελλοντικές προοπτικές ως θεραπευτικοί στόχοι για τον καρκίνο.

Μηχανισμός της γονιδιακής σίγησης μέσω RNAi

Στο βασίλειο των ζώων τα microRNAs (miRNAs) δεσμεύονται από μία πρωτεΐνη Argonaute (AGO) στο σύμπλοκο αποσιώπησης miRISC και αναγνωρίζουν τα mRNA -στόχους τους με ζευγάρωμα βάσεων σε μερικώς συμπληρωματικές θέσεις σύνδεσης, οι οποίες κατά κύριο λόγο βρίσκονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA (Jonas and Izaurralde, 2015). Οι AGO πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με μια πρωτεΐνη GW182, που με τη σειρά της αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική πολυ(A)-συνδεόμενη πρωτεΐνη PABPC και με τα σύμπλοκα των κυτταροπλασματικών απαδενυλασών PAN2-PAN3 και CCR4-NOT (Jonas and Izaurralde, 2015). Τα σύμπλοκα PAN2-PAN3 και CCR4-NOT καταλύουν την απαδενυλίωση του mRNA στόχου. Οι πρωτεΐνες GW182 αποτελούνται από μία αμινοτελική περιοχή δέσμησης της AGO (ABD) και μία περιοχή σίγησης (SD). Σε ζωικές κυτταροκαλλιέργειες, οι απαδενυλιωμένα mRNAs χάνουν την 5'-καλύπτρα τους και αποικοδομούνται ταχέως από την 5' - 3' εξοριβονουκλεάση 1 (XRN1). Επιπλέον, τα miRNAs καταστέλλουν την μετάφραση, αλλά ο ακριβής μοριακός μηχανισμός γι' αυτό παραμένει ασαφής (Jonas and Izaurralde, 2015). Η αναδυόμενη κοινή ομοφωνία είναι ότι τα miRNAs αναστέλλουν την έναρξη της μετάφρασης παρεμβαίνοντας στη δραστηριότητα ή / και τη συναρμολόγηση του συμπλόκου 4F (eIF4F), που αποτελεί τον ευκαρυωτικό

παράγοντα έναρξης. Το σύμπλοκο eIF4F αποτελείται από την πρωτεΐνη eIF4E, που αναγνωρίζει την 5'-καλύπτρα, την πρωτεΐνη προσαρμογέα eIF4G και την RNA ελικάση eIF4A⁹⁹. Η eIF4G χρησιμεύει ως ένα ικρίωμα για την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, που είναι απαραίτητη για την πρόσληψη του 43S συμπλόκου προ-έναρξης, και για την έναρξη της μετάφρασης (Εικόνα 1) (Jonas and Izaurralde, 2015).

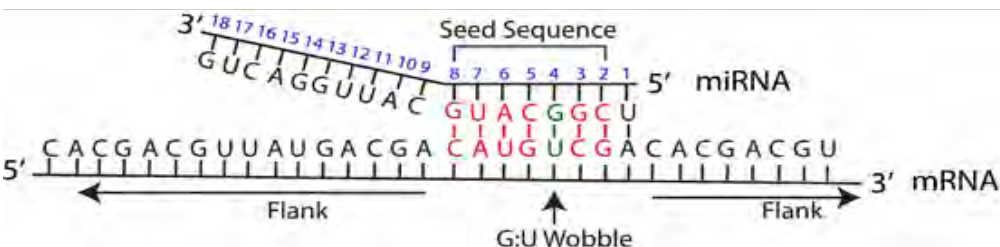


Εικόνα 1. Επισκόπηση της miRNA μεσολαβούμενης γονιδιακής σίγησης σε ζώα.
(Jonas and Izaurralde, 2015)

Η επαγωγή του μηχανισμού της RNAi πυροδοτείται στο κυτταρόπλασμα από ενδογενή microRNAs, που προσδένονται στο AGO2-RISC σύμπλοκο σχηματίζοντας το σύμπλοκο αποσιώπησης miRISC, και αναγνωρίζουν τις περιοχές - στόχους στο αντίστοιχο mRNA, έχοντας ως αποτέλεσμα, είτε την γονιδιακή σίγηση μέσω καταστολής της μετάφρασης του mRNA, είτε την ταχεία αποικοδόμηση του mRNA. (Novina and Sharp, 2004; Carthew and Sontheimer, 2009). Ο βαθμός συμπληρωματικότητας του miRNA-mRNA αποτελεί καθοριστικό παράγοντα του μηχανισμού RNAi, καθώς πλήρης συμπληρωματικότητα επιτρέπει την αποικοδόμηση του mRNA από το ένζυμο Ago, ενώ εσωτερική ατελής συμπληρωματικότητα αποκλείει την αποικοδόμηση του mRNA και προάγει την γονιδιακή σίγηση μέσω καταστολής της μετάφρασης (Carthew and Sontheimer, 2009).

Στα μεταξύ, τα miRNAs ζευγαρώνουν μέσω ατελούς συμπληρωματικότητας με τα mRNAs, έχοντας ως αποτέλεσμα τη γονιδιακή σίγηση μέσω καταστολής της μετάφρασης

Τα miRNAs των ζωικών οργανισμών αναγνωρίζουν συμπληρωματικές περιοχές mRNA-στόχου, που εντοπίζονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή τους (3' untranslated region, 3'-UTR) και ζευγαρώνουν με αυτές μέσω συμπληρωματικότητας βάσεων κατά Watson-Crick. Το γεγονός αυτό γίνεται από τη μία έλικα του miRNA, την λειτουργική έλικα-οδηγό (ή έλικα-επιβάτης). Η κεντρική περιοχή πλαισιώνεται από την περιοχή εκβλάστησης στο 5' άκρο και την περιοχή 3'. Η πιο σημαντική προϋπόθεση στην αλληλεπίδραση miRNA-mRNA, είναι τα νουκλεοτίδια 2-8 της περιοχής 5', γνωστή ως 5'-seed περιοχή (Εικόνα 2). Με πολύ λίγες γνωστές έως τώρα εξαιρέσεις, η περιοχή εκβλάστησης 5' (5'-seed) είναι προαπαιτούμενη για αποτελεσματική σίγηση, αν και το γεγονός αυτό δεν ισχύει πάντα (Vella et al., 2004; Bartel, 2009). Η κεντρική περιοχή των νουκλεοτιδίων 9/10-12 διογκώνεται προεξέχοντας παρεμποδίζοντας την ενδονουκλεολυτική διάσπαση από τις Argonaute πρωτεΐνες (AGOs), που αποτελούν τα βασικά λειτουργικά συστατικά του συμπλόκου RISC του μηχανισμού RNAi (Bartel, 2009; Voinnet, 2009). Εντούτοις, στην περίπτωση της ενδονουκλεολυτικής διάσπασης του mRNA-στόχου, η κεντρική περιοχή είναι αυτή που καθορίζει τη θέση διάσπασης του στόχου. Η περιοχή 3' θεωρείται πιο ανεκτική σε αναντιστοιχίες και σε σπάνιες περιπτώσεις αδύναμης ζεύξης στην περιοχή εκβλάστησης 5', η συμπληρωματικότητα στην 3' περιοχή μπορεί να συνεισφέρει στην επιλογή του στόχου (Brennecke et al., 2005; Grimson et al., 2007).

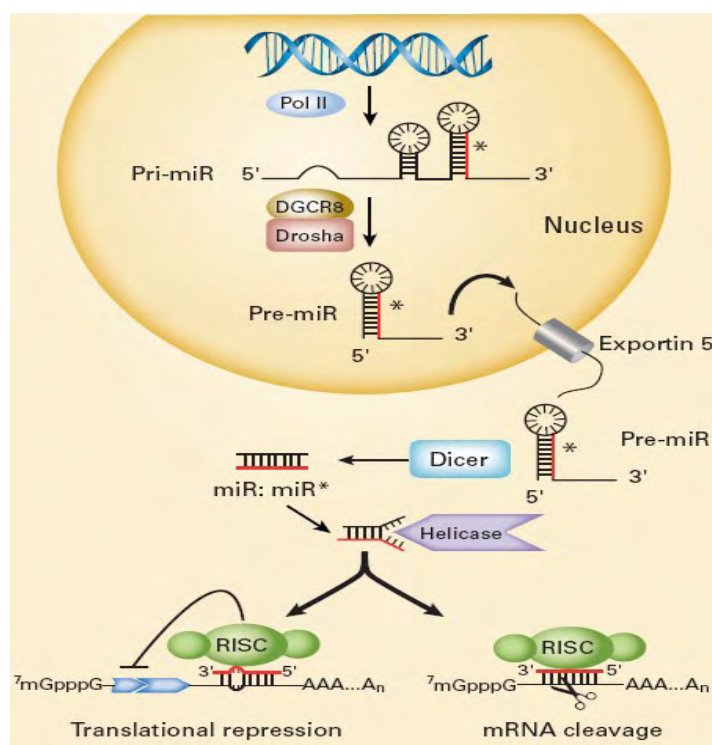


Εικόνα 2. Αναγνώριση mRNA-στόχου από το miRNA μέσω συμπληρωματικότητας
(Peterson *et al.*, 2014)

Βιογένεση των miRNAs

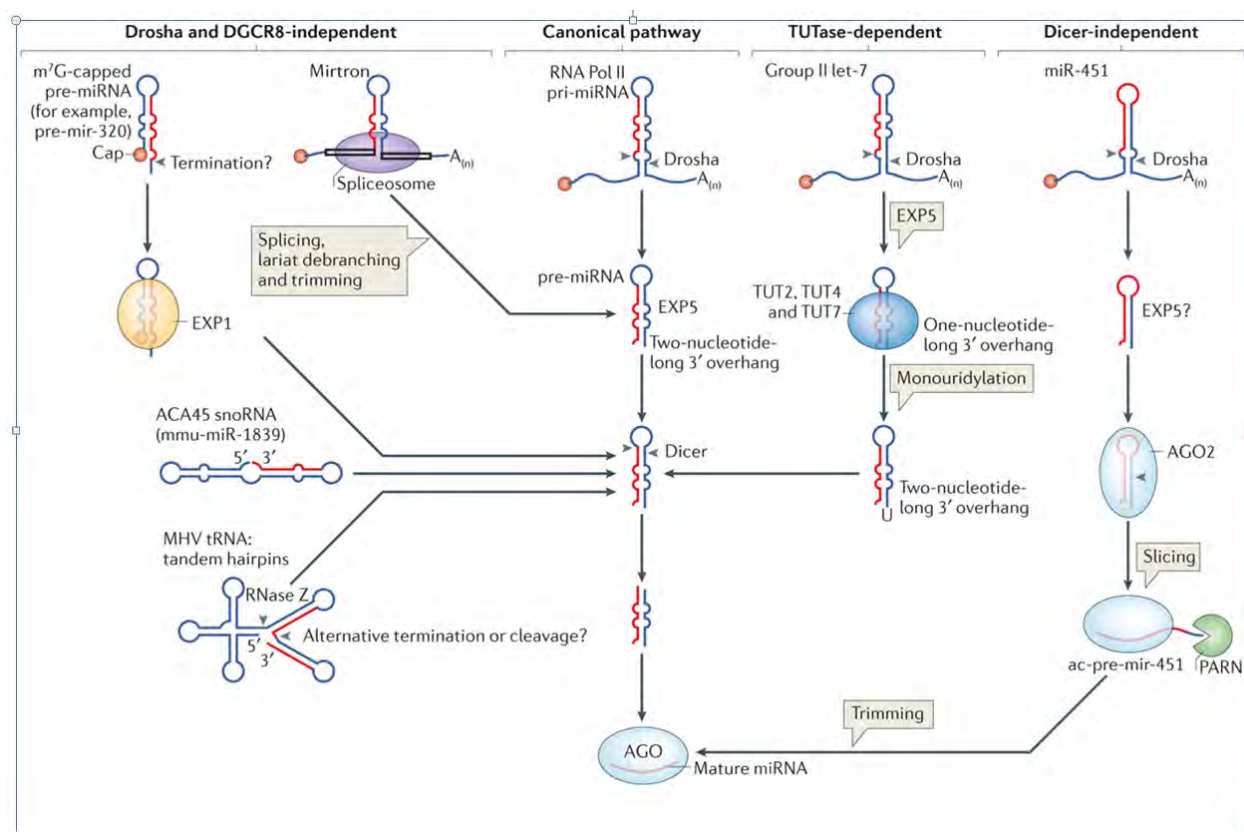
Η βιογένεση των miRNAs ποικίλει ακολουθώντας διαφορετικά μονοπάτια, αντανακλώντας έτσι την ρύθμιση των διεργασιών αυτών από διαφορετικούς μηχανισμούς και εξελικτική ευελιξία. Τα μονοπάτια της βιογένεσης των miRNAs χωρίζονται σε ένα κανονικό και σε ένα εναλλακτικό μονοπάτι (Krol et al, 2010).

Το κανονικό μονοπάτι (Εικόνα 3) αναφέρεται στα μετάγραφα (pri-miRNAs) που προκύπτουν με δράση της RNA πολυμεράσης II (RNAP II) (Krol et al, 2010). Τα pri-miRNAs, που βρίσκονται στον πυρήνα και φέρουν αναδιπλώσεις φουρκέτας, σταθεροποιούνται με 3'πολύ (A) ουρά και 5'-καλύπτρα, και αποτελούν υπόστρωμα για δύο ριβονουκλεάσες, τη Drosha και τη Dicer (και οι 2 αποτελούν RNase III), οι οποίες λειτουργούν σε συνεργασία με πρωτεΐνες πρόσδεσης σε δίκλωνο RNA (π.χ. DGCR8) (Krol et al, 2010). Το σύμπλοκο Drosha - DGCR8 επεξεργάζεται το pri-miR, παράγοντας έτσι το πρόδρομο μόριο pre-miR (~70 nt), το οποίο εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα, όπου η Dicer καταλύει τη διάσπαση του pre-miR σε μικρά δίκλιωνα κομμάτια miRNA/miRNA μήκους ~20 nt (Krol et al, 2010). Η μία αλυσίδα από τις δύο κάθε δίκλωνου κομματιού RNA συνιστά ένα ώριμο miRNA και τον κλώνο-οδηγό (guide strand), ο οποίος ενώνεται με μια Ago πρωτεΐνη (RNάσηΗ ενδονουκλεάση), σχηματίζοντας έτσι το σύμπλοκο αποσιώπησης miRISC (Krol et al, 2010).



Εικόνα 3. Κανονικό μονοπάτι της βιογένεσης των miRNAs (Iorio and Croce, 2009)

Τα εναλλακτικά μονοπάτια παράγουν miRNAs, παρακάμπτοντας ένα από τα βήματα επεξεργασίας από RNase III (είτε της Drosha, είτε της Dicer) (Εικόνα 4).

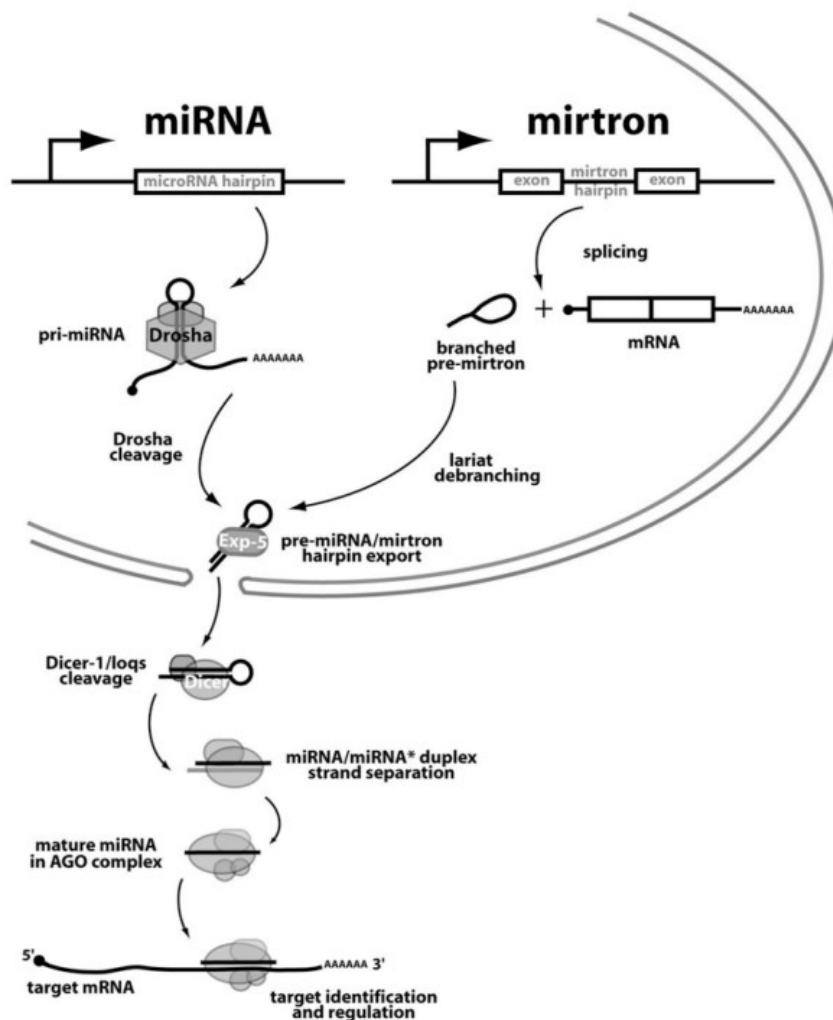


Εικόνα 4. Εναλλακτικά μονοπάτια βιογένεσης των miRNAs (*Ha and Kim, 2014*)

Για παράδειγμα, τα miRNAs που προέρχονται από ιντρόνια, τα αποκαλούμενα mirtrons (Okamura et al., 2007; Ruby et al., 2007), τα miRNAs που προέρχονται από μικρά πυρηνικά RNAs (snoRNAs) (Brameier et al., 2011; Taft et al., 2009), τα miRNAs που προέρχονται από t-RNAs (Cole et al., 2009), και τα miRNAs που προκύπτουν μέσω tRNase Z (Bogerdt et al., 2010) παράγονται μέσω ενός μονοπατιού ανεξάρτητου από τη Drosha.

Συγκεκριμένα, τα mirtrons μπορούν να παρακάμψουν την τμήση από τη Drosha, δεδομένου ότι το ιντρόνιο που προκύπτει από το μάτισμα του mRNA, έχει το κατάλληλο μήκος για να σχηματίσει βρόγχο παρόμοιο με ένα πρόδρομο miRNA (pre-miRNA) (Εικόνα 5) (Okamura et al., 2007; Ruby et al., 2007). Το pre-miRNA που προκύπτει, συνίσταται από ~ 60-75 νουκλεοτίδια, έχοντας μορφή βρόγχου και μία προεξοχή δύο νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο του (Lee et al., 2002; Bartel, 2004; Cai et al., 2004; Han et al., 2004). Εφόσον έχει γίνει σωστά η επεξεργασία του pre-miRNA (φέροντας μία μικρή δομή στελέχους-βρόγχου και μία 3' προεξοχή) αυτό μπορεί να εξέλθει στο κυτταρόπλασμα μέσω σύνδεσης με την Exportin 5 σε σύμπλοκο με την Ran-GTP (Yi et al., 2003; Lund et al., 2004).

Περαιτέρω επεξεργασία στο κυτταρόπλασμα από τη Dicer αφαιρεί τον βρόγχο από το pre-miRNA, αφήνοντας άλλο ένα προεξέχον 3' άκρο στην άλλη πλευρά του μορίου (Kim, 2005). Οι προηγούμενες διεργασίες έχουν ως αποτέλεσμα ένα ώριμο miRNA διπλής έλικας των 19-24 νουκλεοτιδίων, με δύο νουκλεοτίδια να προεξέχουν στο κάθε 3' άκρο.

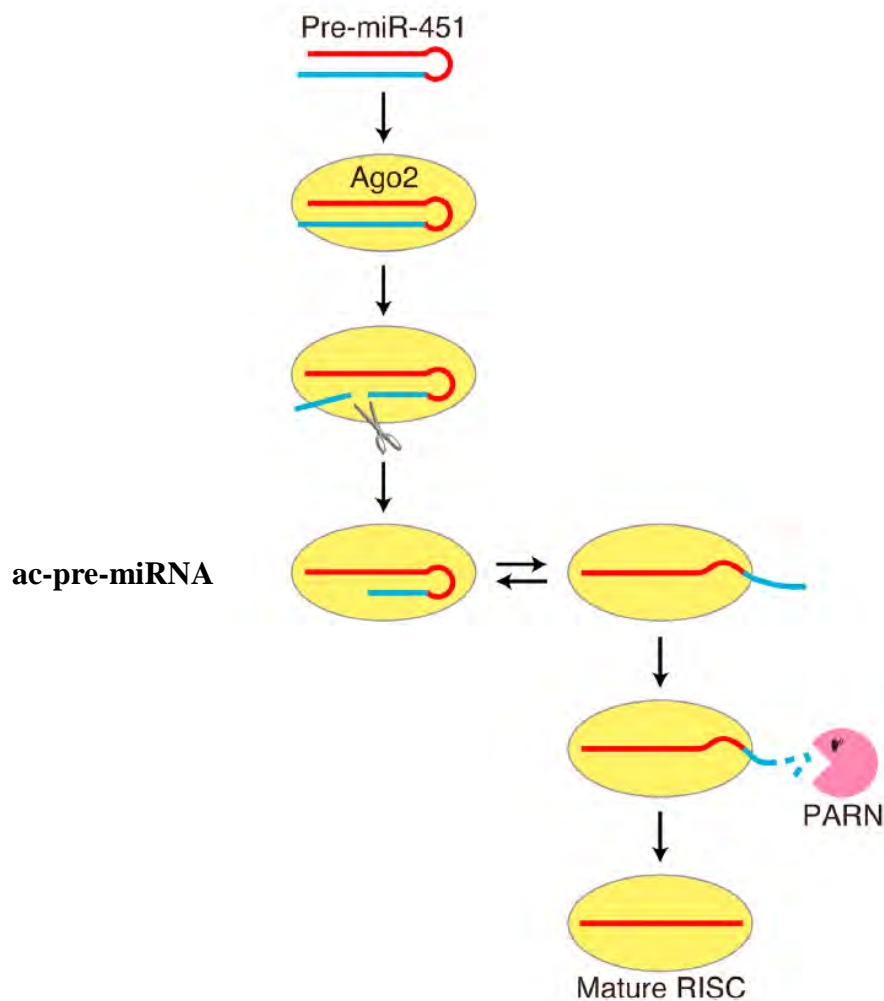


Εικόνα 5. Μονοπάτι βιογένεσης miRNAs που προέρχονται από ιντρόνια (mirtrons)

(Okamura et al., 2007)

Αντίθετα, η ωρίμανση του miR-451, το οποίο αποτελεί ένα ισχυρά συντηρημένο ερυθροποιητικό miRNA των σπονδυλωτών, απαιτεί το ένζυμο Drosha αλλά παρακάμπτει τον ένζυμο Dicer (Εικόνα 6) (Yoda et al, 2013). Αρχικά το pri-miR-451 τέμνεται από το σύμπλοκο Drosha/DGCR8, κι έτσι παράγεται ένα κοντό μόριο των 17 bp, το pre-miR-451, το οποίο δεν έχει το κατάλληλο μήκος για τμήση από τη Dicer, και έτσι διοχετεύεται κατευθείαν στο AGO2 (Cheloufi et al., 2010; Cifuentes et al., 2010; Yang et al., 2010). Στα θηλαστικά η AGO2, που λειτουργεί ως RNάση H - ενδονουκλεάση, τέμνει το 3' άκρο του

pre- miR-451, παράγοντας έτσι ένα ενδιάμεσο μόριο RNA μήκους ~30 nt, το ac-pre-miRNA, του οποίου το 3' άκρο χρειάζεται επιπλέον επεξεργασία για την δημιουργία του ώριμου miR-451 (Cheloufi et al., 2010; Cifuentes et al., 2010; Yang et al., 2010). Σύμφωνα με τους Yoda et al (2013), το ένζυμο που απαιτείται για την επεξεργασία του 3' άκρου του ac-pre-miRNA, ώστε να παραχθεί το ώριμο miR-451, είναι η πολύ (A) - εξειδικευμένη ριβονουκλεάση PARN (Yoda et al., 2013).



Εικόνα 6. Μονοπάτι βιογένεσης του miR-451 (Yoda et al, 2013)

Αποικοδόμηση των miRNAs

Η σταθερότητα και η δράση των miRNAs ρυθμίζεται σε μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο (Katoh et al., 2015). Το 3' άκρο των miRNAs συχνά υποβάλλεται σε μετα - μεταγραφική ουριδυλίωση, αδενοίωση και 2' - Ο - μεθυλίωση (Katoh et al., 2015). Οι τροποποιήσεις αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της βιογένεσης, της λειτουργίας και της σταθερότητας των miRNAs (Katoh et al., 2015).

Αν και δεν είναι γνωστά πολλά για τους παράγοντες που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των miRNAs, πρόσφατες έρευνες έχουν φέρει στο φώς μηχανισμούς, με τους οποίους τα ώριμα miRNAs αποικοδομούνται (Ramachandran and Chen, 2008; Bosse et al., 2013; Katoh et al., 2015; Das et al., 2010).

Σύμφωνα με τους Ramachandran and Chen (2008) μία οικογένεια εξωριβονουκλεασών, που κωδικοποιείται από γονίδια μικρών RNA νουκλεασών (Small RNA degrading nuclease -SDN), είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση ώριμων miRNAs στο φυτό *Arabidopsis*. Συγκεκριμένα, η SDN1 δρα ειδικά σε μονόκλινα miRNAs και παρουσιάζει ευαισθησία για το 2' - Ο - μεθυλιωμένο 3' άκρο του miRNA.

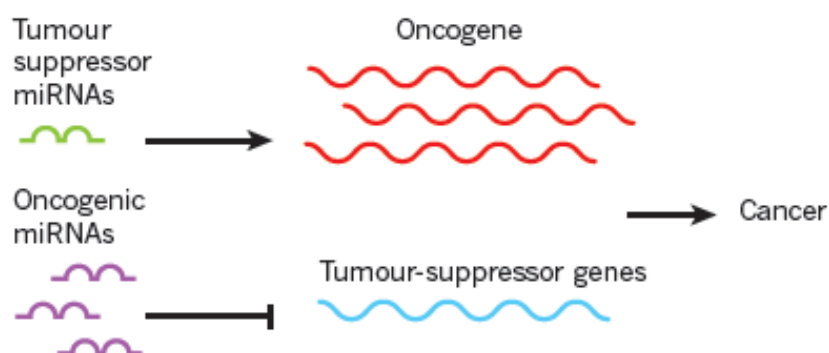
Αντίστοιχα στο μετάζωο *Caenorhabditis elegans* αναγνωρίστηκε μία πρωτεΐνη συνοδός (DCS 1), η οποία σχηματίζει σύμπλοκο με την εξωνουκλεάση XRN-1, και αποικοδομεί τα miRNAs που απελευθερώνονται από το miRISC (Bosse et al., 2013). Το ένζυμο DCS 1 δρα ως πυροφωσφατάση και υδρολύει τα κατάλοιπα της 5' καλύπτρας των miRNAs (Bosse et al., 2013).

Μία εξίσου σημαντική έρευνα πραγματοποιήθηκε από τους Katoh et al (2015), ο οποίοι μελέτησαν το miR-122, το οποίο εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα, και σταθεροποιείται με αδενοίωση του 3' άκρου, μέσω της κυτοπλασματικής πολύ (A) πολυμεράσης GLD-2. Στην εργασία τους οι Katoh et al (2015), αναφέρουν πως η πολυ (A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση PARN είναι υπεύθυνη για την απαδενοίωση και την αποσταθεροποίηση του miR-122. Επιπρόσθετα, η CUG πρωτεΐνη πρόσδεσης 1 (CUGBP 1) αλληλεπιδρά ειδικά με το miR-122 και άλλα miRNAs πλούσια σε UG, προάγοντας έτσι την απαδενοίωση και αποσταθεροποίησή τους μέσω της PARN απαδενοίωσης (Katoh et al., 2015).

miRNAs και καρκίνος

Η σύνδεση ανάμεσα στα miRNAs και στον καρκίνο, έχει προκύψει από μελέτες που αποκαλύπτουν ότι η απορύθμιση των miRNAs, διαταράσσει τον κυτταρικό κύκλο, τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενώ επίσης η έκφραση πολλών miRNAs μεταβάλλεται σε πρώιμους όγκους στον άνθρωπο (Calin et al., 2002; Calin et al., 2004a; He et al., 2005a; Lu et al., 2005). Τα miRNAs φαίνεται να επιτελούν σημαντικές λειτουργίες σε περιπτώσεις ανθρώπινων καρκίνων, λόγω του γεγονότος ότι τα επίπεδά τους απορυθμίζονται με εξειδικευμένο τρόπο, σύμφωνα με τον τύπο του καρκίνου, παρέχοντας έτσι ένα ακριβές αποτύπωμα έκφρασης (Volinia et al., 2006; Lanza et al., 2007). Επιπλέον, τα miRNAs έχουν αναδειχθεί ως κρίσιμοι παράγοντες που συνδέονται με τον καρκίνο σε όλα τα στάδια, από την έναρξη μέχρι και την μετάσταση (Jiang et al., 2014).

Τα miRNAs μπορούν να λειτουργούν είτε ως ογκογονίδια, ή ως ογκοκατασταλτικοί παράγοντες (Εικόνα 7). Τέτοια miRNAs χαρακτηρίζονται ως ογκογόνα miRNAs ή “oncomiRs” (Esquela-Kerscher and Slack, 2006; Slack and Weidhaas, 2006; Krutovskikh and Herceg, 2010).

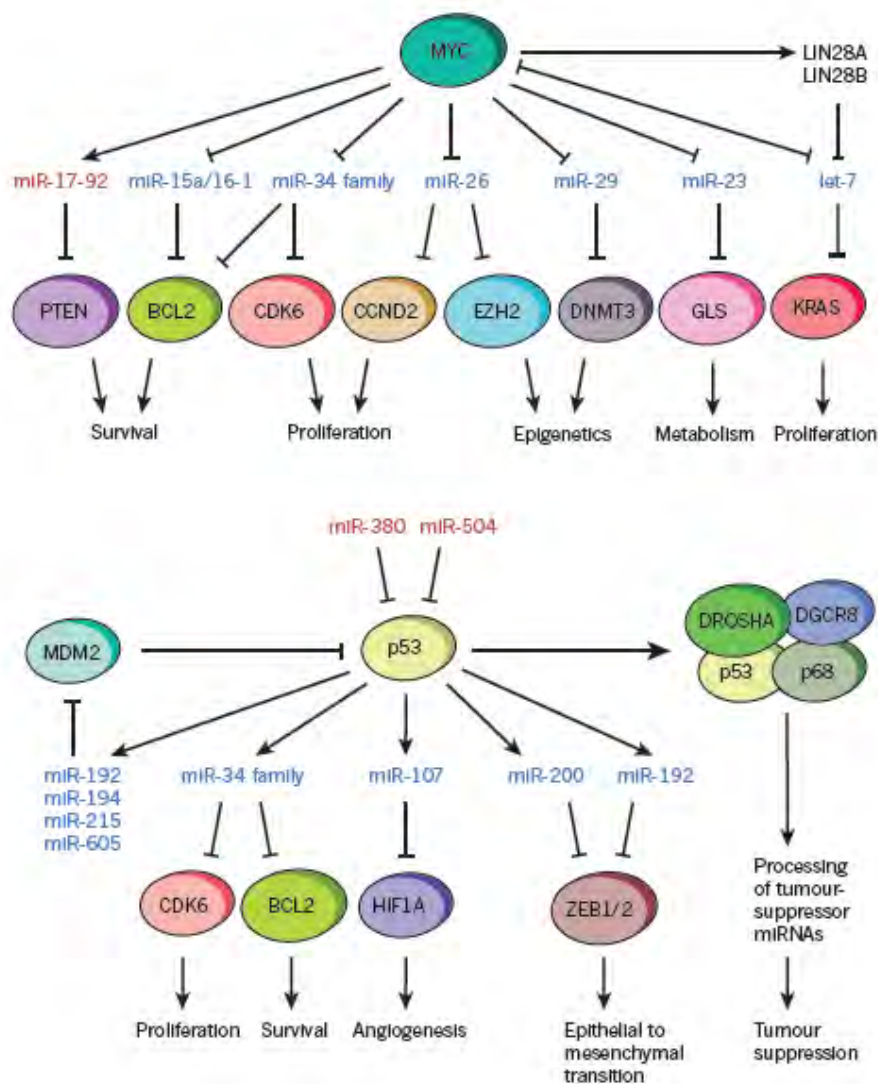


Εικόνα 7. Τα miRNAs μπορούν να λειτουργούν είτε ως ογκογονίδια, ή ως ογκοκατασταλτικοί παράγοντες (Lujambio and Lowe, 2012)

Τα miRNAs με μειωμένη έκφραση σε καρκινικά κύτταρα θεωρούνται ογκοκατασταλτικοί παράγοντες, καθώς αυτά συνήθως παρεμποδίζουν την καρκινική ανάπτυξη, αναστέλλοντας έτσι ογκογονίδια και γονίδια που ελέγχουν την κυτταρική διαφοροποίηση και την απόπτωση (Εικόνα 8). Είναι χαρακτηριστική η ογκοκατασταλτική ικανότητα των μελών της οικογένειας miR-29, τα οποία εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, προάγοντας την απόπτωση τους (Jiang et al., 2014). Συγκεκριμένα, τα miR-29 μπορούν να επάγουν την p53-εξαρτώμενη κυτταρική απόπτωση,

καθώς στοχεύουν παράγοντες όπως ο p85 και CDC42, οι οποίοι ρυθμίζουν αρνητικά τον ογκοκατασταλτικό παράγοντα p53 (Park et al., 2009b).

Από την άλλη πλευρά, πολλά γονίδια των miRNAs έχουν βρεθεί σημαντικά υπερεκφρασμένα σε διαφορετικούς καρκινικούς τύπους (Lujambio and Lowe, 2012). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το miR 1207, το οποίο υπερεκφράζεται σε καρκίνο των ωοθηκών, και στοχεύει άμεσα 3 αρνητικούς ρυθμιστές (SFRP1, AXIN2, ICAT) του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/ b- catenin, με αποτέλεσμα την συνεχόμενη ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού (Wu et al, 2015).



Εικόνα 8. Καταρράκτες ρύθμισης των σημαντικότερων miRNAs που εμπλέκονται στην ογκογένεση (Lujambio and Lowe, 2012)

Έχουν αναπτυχθεί απλές και επαναλήψιμες δοκιμές για την ανίχνευση των επιπέδων των miRNAs, και μέθοδοι που συνδυάζουν απομόνωση RNA, PCR και αλληλούχιση, καθώς και οι μικροσυτοιχίες, επιτρέπουν ακριβή και ποσοτική αξιολόγηση όλων των

miRNAs που εκφράζονται σε ένα δείγμα ασθενούς (Lujambio and Lowe, 2012). Συγκριτική ανάλυση των επιπέδων των miRNAs σε στερεούς όγκους και φυσιολογικούς ιστούς αποκάλυψε ένα εξειδικευμένο αποτύπωμα έκφρασης του συνόλου των miRNAs (“miRNome”), αποτελούμενο από υπερεκφρασμένα, αλλά και υποεκφρασμένα miRNAs (Volinia et al., 2006). Θεωρείται ότι η έκφραση των miRNAs γενικά επάγει τη διαφοροποίηση των κυττάρων, κάτι που δικαιολογεί την μειωμένη έκφραση ενός υποσυνόλου miRNAs στον καρκίνο, στον οποίο τα κύτταρα αποδιαφοροποιούνται (Lujambio and Lowe, 2012).

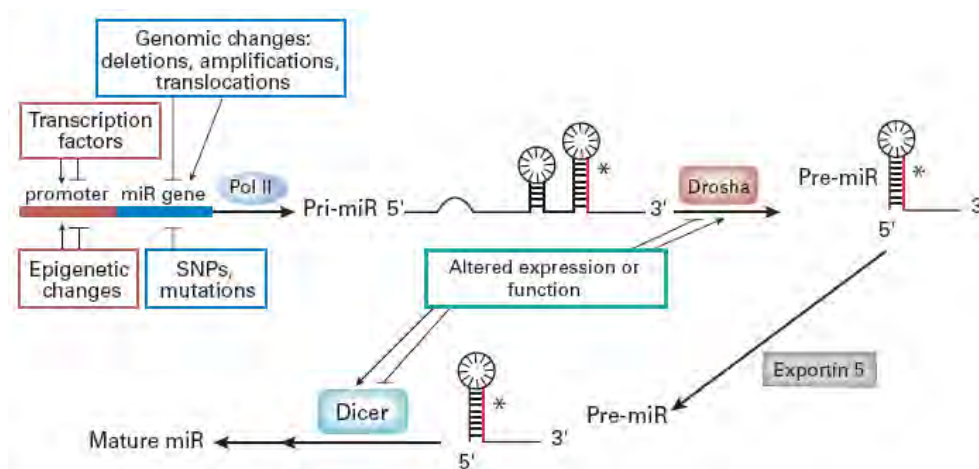
Τα πρώτα στοιχεία για την εμπλοκή των miRNAs στον καρκίνο ανήλθαν από μία μοριακή μελέτη για τον χαρακτηρισμό της 13q14 χρωμοσωμικής απαλοιφής στην ανθρώπινη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία των B-λεμφοκυττάρων (B-CLL). Η περιοχή αυτή περιέχει τα miR-15a και miR-16-1 και απαλείφεται στις περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις της ασθένειας (Calin et al., 2002).

Αργότερα, βρέθηκε ότι και το miR-15a και το miR-16-1 ενισχύουν την φυσιολογική αποπτωτική απόκριση μέσω της στόχευσης του αντι-αποπτωτικού γονιδίου BCL-2 (Cimmino et al., 2005). Το let-7, το δεύτερο miRNA που ταυτοποιήθηκε, θεωρείται ογκοκατασταλτικός παράγοντας. Δώδεκα let-7 ομόλογα έχουν αναγνωριστεί στο ανθρώπινο γονιδίωμα, που οργανώνονται σε οκτώ συστοιχίες, τέσσερις από τις οποίες εντοπίζονται μέσα σε περιοχές συχνά απαλειφόμενες σε διάφορες ανθρώπινες κακοήθειες (Calin et al., 2004a). Η δυνητική τους δραστηριότητα ως ογκοκατασταλτικοί παράγοντες ενισχύεται επιπλέον και από το γεγονός ότι τα μέλη της οικογένειας let-7 ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση ειδικών ογκογονιδίων, όπως το RAS και το MYC, αλλά και την ομάδα A2 υψηλής κινητικότητας (HMGA2) (Johnson et al., 2005; Mayr et al., 2007; He et al., 2010). Έτσι, η απώλεια του let-7 σε καρκίνους του πνεύμονα, σχετίζεται με υψηλή έκφραση της ογκογόνου πρωτεΐνης RAS, παρέχοντας έναν μηχανισμό μέσω του οποίου τα μειωμένα επίπεδα του let-7 προάγουν την ογκογένεση (Johnson et al., 2005).

Διαφορετικές μελέτες αποκάλυψαν ότι το ίδιο μόριο miRNA μπορεί να δρα ως ογκογονίδιο ή ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας ανάλογα με τις ειδικές συνθήκες του ιστού και τα γονίδια-στόχους που εκφράζονται εκεί. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το miR-221 και το miR-222. Υπερέκφραση αυτών των miRNAs προάγει την πρόοδο της ογκογένεσης του ήπατος και έχει προταθεί ότι τα miR-221 και miR-222 μαζί με τα miR-21, miR-93, miR-96 και miR-106b θα πρέπει να θεωρούνται ως bona fide oncomiRs (Pineau et al., 2010). Ωστόσο, έχειδειχθεί ότι τα miR-221 και miR-222 αναστέλλουν την ερυθροποίηση μέσω αρνητικής ρύθμισης του CD117 (ή c-kit), ο οποίος αποτελεί γνωστό

πρωτο-ογκογονίδιο (McIntyre et al., 2005), δρώντας έτσι ως ογκοκατασταλτικοί παράγοντες (Felli et al., 2005).

Περισσότερα από τα μισά miRNAs που έχουν απορρυθμισμένο πρότυπο έκφρασης στον καρκίνο. (Calin et al., 2004a). Το απορρυθμισμένο πρότυπο έκφρασης προκύπτει είτε λόγω της υπερέκφρασης, είτε λόγω της υποέκφρασης ενός miRNA (Lujambio and Lowe, 2012). Τα miRNAs εντοπίζονται σε χρωμοσωμικές περιοχές που εμπλέκονται στον καρκίνο, οι οποίες αποτελούν εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις (Calin and Croce, 2006b). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι στους ανθρώπινους όγκους σε περιοχές όπου εντοπίζονται αλληλουχίες από τις οποίες προκύπτουν τα miRNAs υπάρχει αυξημένη συχνότητα γενωμικών μεταλλάξεων (Zhang et al., 2006). Η διαφοροποιημένη έκφραση των miRNAs στον καρκίνο γενικά, μπορεί να οφείλεται σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες, όπως είναι πολυμορφισμοί (SNPs) που εντοπίζονται στους γεντικούς τόπους των miRNAs (Calin et al., 2004), σε μεταγραφικό έλεγχο από ογκογόνους μεταγραφικούς παράγοντες (O'Donnell et al., 2005), καθώς επίσης και σε επιγενετικό έλεγχο, όπως η DNA μεθυλίωση ή αποακετυλίωση των ιστονών των προαγωγέων τους (Εικόνα 9) (Saito et al., 2006; Lujambio et al., 2007; O'Donnell et al., 2005).



Εικόνα 9. Έλεγχος της απορρυθμισμένης έκφρασης των miRNAs στον καρκίνο
(Iorio and Croce, 2009)

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η υπερμεθυλίωση του προαγωγέα του miR127, η οποία φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την σίγηση του miRNA στα καρκινικά κύτταρα (Saito et al., 2006). Έχει προταθεί ότι η μειωμένη έκφραση κάποιων miRNAs στον καρκίνο, βρίσκεται υπό τον μεταγραφικό έλεγχο κάποιων ογκογόνων μεταγραφικών παραγόντων, όπως είναι ο MYC (Chang et al., 2008).

Επιπλέον, η μειωμένη έκφραση των miR-15 και του miR-16 στην χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (CLL) (Calin et al., 2002), και του miR-218 στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Schwarz et al., 2004), σχετίζεται με ειδικές χρωμοσωμικές απαλοιφές. Από την άλλη μεριά, η υπερέκφραση του miR-17-92 προκύπτει με διπλασιασμό του γενετικού του τόπου (He et al., 2005b).

Ένας έμμεσος μηχανισμός που ελέγχει την miRNA-επαγόμενη σίγηση είναι η απώλεια των θέσεων αναγνώρισης/πρόσδεσης του στόχου από τα miRNAs (Veronese et al., 2011). Αν και αυτός ο μηχανισμός δεν αλλάζει τα επίπεδα των miRNAs, η διάρρηξη της miRNA-επαγόμενης σίγησης μπορεί να οδηγήσει σε ανώμαλους φαινοτύπους επάγοντας ογκογόνο μετασχηματισμό των κυττάρων (Lee et al., 2005; Mayr et al., 2007).

Επιπρόσθετα, τα επίπεδα των miRNAs, είναι πιο αξιόπιστα για την ταξινόμηση των ελάχιστα διαφοροποιημένων όγκων, σε σχέση με τα πρότυπα έκφρασης των mRNAs, αφού τα τελευταία αποδείχθηκαν εξαιρετικά ανακριβή (Lu et al., 2005). Σ' αυτήν την κατεύθυνση, μια ομάδα επιστημόνων κατάφερε να ορίσει ένα σύστημα ταξινόμησης αγνώστων όγκων, βασισμένο σε 48 miRNAs (Rosenfeld et al., 2008). Αυτά τα αποτυπώματα των miRNAs υποδεικνύουν την προέλευση των μεταστατικών καρκίνων με υψηλή ακρίβεια και είναι πιο αντιπροσωπευτικά/ενδεικτικά του τύπου του καρκίνου, του σταδίου αλλά και των παθοφυσιολογικών χαρακτηριστικών, σε σχέση με τα πρότυπα έκφρασης των mRNAs. Δύο διακριτοί αλλά ιστολογικά παρόμοιοι υπότυποι του καρκίνου του παχέος εντέρου, μπορούν να διαφοροποιηθούν καθώς 14 miRNA παρουσιάζουν ειδικά πρότυπα έκφρασης μεταξύ των δύο υποτύπων (Lanza et al., 2007; Schepeler et al., 2008). Όσον αφορά τον καρκίνο του μαστού, δύο επιστημονικές ομάδες ταυτοποίησαν μοναδικά υποσύνολα από miRNAs που θα μπορούσαν με ακρίβεια να ταξινομήσουν τον καρκίνο του μαστού ως αυλικού τύπου A, αυλικού τύπου B, βασικού-τύπου (γνωστός και ως τριπλά αρνητικός καρκίνος μαστού), υποτύπου HER2+, HER2, ER+, ER- (Mattie et al., 2006; Blenkiron et al., 2007). Επιπλέον, δείχθηκε ότι το miR-205 είναι ένας εξαιρετικά εξειδικευμένος δείκτης που μπορεί να διακρίνει το αδενοκαρκίνωμα από καρκίνο πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα με υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση (Lebanony et al., 2009). Διαφοροποιημένα πρότυπα έκφρασης των miRNAs παρατηρούνται επίσης σε κυτταρογενετικούς και μοριακούς υποτύπους της οξείας παιδιατρικής μυελοειδούς λευχαιμίας (Newshean et al., 2011). Οι μελέτες που προαναφέρθηκαν προτείνουν ότι τα miRNAs μπορεί να επηρεάζουν την παθογένεια των καρκινικών υποτύπων, κι έτσι μπορούν να αποτελέσουν διαγνωστικούς δείκτες διαφοροποίησης.

miRNAs και διάγνωση του καρκίνου

Η καθιέρωση νέων κλινικών εργαλείων για την πρόγνωση και τη διάγνωση του καρκίνου είναι πρωταρχικής σημασίας, καθώς η πλειοψηφία των όγκων ταυτοποιείται σε προχωρημένα στάδια της ασθένειας, εμποδίζοντας έτσι την έγκαιρη απόκριση και θεραπεία. Τρέχουσες μελέτες εστιάζουν στον καθορισμό νέων δεικτών με την ικανότητα να προσδιορίζουν πρωταρχικές αλλοιώσεις ή καρκίνους σε πρώιμα στάδια (Nowsheen et al., 2011). Μια μελέτη του προτύπου έκφρασης miRNAs μεγάλης κλίμακας σε όγκους του μαστού, του πνεύμονα, του στομάχου, του παχέος εντέρου, και του παγκρέατος, αποκάλυψε διαφοροποιημένα πρότυπα έκφρασης για τον κάθε τύπο καρκίνου, (Volinia et al., 2006; Yanaihara, et al 2006; Calin et al., 2005) γεγονός που αποτελεί παρατήρησ- κλειδί, καθώς σε όλους τους τύπους των καρκίνων υπήρχαν μερικά miRNAs με το ίδιο πρότυπο απορύθμισης, τα οποία πιθανόν να συμμετέχουν σε βασικά μονοπάτια πρόκλησης του όγκου (Calin and Croce 2006a).

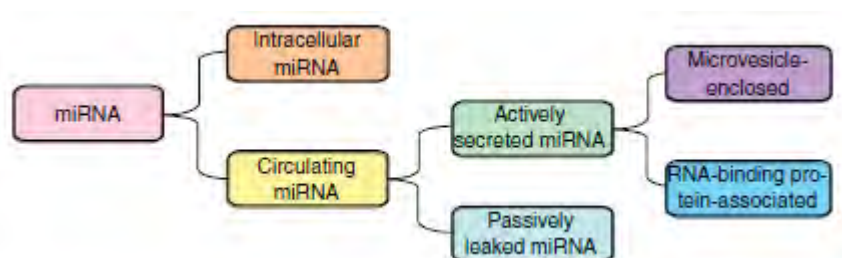
Προκειμένου να ενσωματωθούν τα miRNAs ως βιοδείκτες για την διάγνωση του καρκίνου σε κλινική εφαρμογή, θα πρέπει να πληρούν κάποιες προϋποθέσεις, όπως: α) να είναι ικανά να ταυτοποιούν έναν όγκο σε πρώιμο στάδιο, πριν τη μετάσταση, αυξάνοντας έτσι τη βιωσιμότητα, β) να παρακολουθούν την μοριακή διαφοροποίηση στην εξέλιξη του καρκίνου και της ασθένειας, και γ) να λειτουργούν ως δείκτες της απόκρισης του ασθενούς στη θεραπεία. Τα miRNAs μπορούν να ανιχνευτούν από μία μικρή ποσότητα δείγματος ιστού, που απαιτείται για την ιστολογική αξιολόγηση και είναι άμεσα ερμηνεύσιμα (Mattie et al., 2006). Τα miRNAs έχουν κι άλλα σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των κλασσικών πρωτεϊνικών δεικτών και των mRNAs. Αντίθετα με τις τωρινές χρησιμοποιούμενες πρωτεΐνες ως δείκτες, τα miRNAs μπορούν να απομονωθούν με διαθέσιμους υψηλής συγγένειας παράγοντες παγίδευσης και παρουσιάζουν μικρότερη περιπλοκότητα, καθώς δεν υπόκεινται σε μετεπεξεργαστικές τροποποιήσεις (Wang et al., 2009). Σε αντίθεση με τα mRNAs, τα miRNAs έχουν το πλεονέκτημα του μεγαλύτερου χρόνου ημιζωής in vivo και είναι πιο σταθερά in vitro (Tang et al., 2006; Waldman and Terzic, 2007).

Συμπληρωματικά, τα αποτυπώματα miRNAs μπορεί να υπερισχύουν των προτύπων έκφρασης των mRNA, καθώς αποτελούν κυρίαρχα ρυθμιστικά μόρια (Chen, 2005, Lu et al., 2005). Σε μερικές περιπτώσεις, μόνο μερικά miRNAs είναι σταθερά απορρυθμισμένα, δρώντας έτσι ως δυνητικά ικανά εργαλεία για τον εντοπισμό και την αξιολόγηση της εξέλιξης του καρκίνου (Hayes et al, 2014).

miRNAs και διάγνωση του καρκίνου

Πρόκληση στη διάγνωση του καρκίνου είναι η εφαρμογή μη-επεμβατικών εργαλείων, η οποία έχει οδηγήσει σε αυξημένο ενδιαφέρον για την ενσωμάτωση κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων σε κλινική εφαρμογή για τη διάγνωση του καρκίνου. (Tsang and Lo 2007).

Πρόσφατα βρέθηκαν σταθερά μόρια miRNAs να κυκλοφορούν σε σωματικά υγρά (Εικόνα 10), συμπεριλαμβανομένου του ορού (Chen et al., 2008), του πλάσματος (Mitchell et al., 2008), του σάλιου (Park et al., 2009a), των ούρων (Hanke et al., 2010) και του γάλατος (Kosaka et al., 2010;). Επιπλέον, τα κυκλοφορούντα miRNAs είναι σημαντικά διαφοροποιημένα σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι ο καρκίνος (Park et al., 2009a; Hanke et al., 2010; Kosaka et al., 2010).



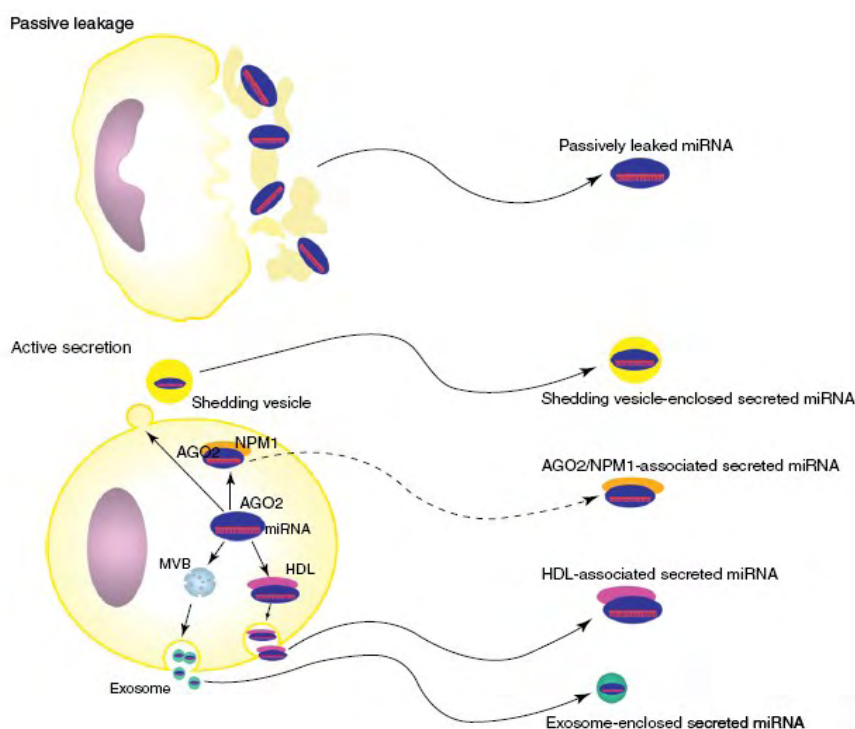
Εικόνα 10. Κατάταξη των miRNAs με βάση τον εντοπισμό τους (Chen et al., 2012)

Τα κυκλοφορούντα miRNAs μπορούν να θεωρηθούν ως βοηθητικοί μη-επεμβατικοί βιοδείκτες για διάφορες φυσιολογικές ή παθολογικές συνθήκες (Gilad et al., 2008; Cortez and Calin, 2009). Όσον αφορά την διάγνωση του καρκίνου, διάφορες μελέτες έδειξαν ότι τα miRNAs θα μπορούσαν να απομονωθούν από ανθρώπινα σωματικά υγρά και να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες (Chen et al., 2008; Lawrie et al., 2008; Mitchell et al., 2008). Έτσι, δείχθηκε ότι τα επίπεδα του miR-21 ήταν αυξημένα στον ορό ασθενών που έπασχαν από διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα B-κύτταρα, αλλά και στον καρκίνο των ωοθηκών (Lawrie et al., 2008; Resnick et al., 2009), και έτσι αποκαλύφθηκε μια στενή σύνδεση μεταξύ κυκλοφορούντων miRNAs και όγκων (Chen et al., 2008). Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα πρότυπα των miRNAs στην κυκλοφορία του αίματος θα μπορούσαν να ανιχνεύσουν τον καρκίνο του παχέος εντέρου σε πρώιμα στάδια, όπου είναι κλινικά ασυμπτωματικός (Huang et al., 2010).

Αν και το RNA θεωρείται γενικά ένα πολύ εύαλωτο μόριο, έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα των miRNAs στα κυκλοφορούντα υγρά, μπορούν να καταστούν αξιόπιστα, καθώς

παραμένουν σταθερά κάτω από χειρισμούς, όπως ο βρασμός, οι υπερβολικές αλλαγές του pH, η μακροχρόνια αποθήκευση και οι πολλαπλοί κύκλοι κατάψυξης-απόψυξης, καθώς και ανθεκτικά σε χειρισμό με RNase (Chen et al., 2008; Gilad et al., 2008; Mitchell et al., 2008; Ho et al., 2010).

Σχετικά με την προέλευση των κυκλοφορούντων miRNAs, υπάρχει η υπόθεση ότι απελευθερώνονται από πολλαπλασιαζόμενα λυμένα κύτταρα του όγκου, ή από καρκινικά κύτταρα που μετατρέπονται σε διηθητικά (Kosaka et al., 2010). Τρία διαφορετικά μονοπάτια έχουν προταθεί: α) η παθητική διαρροή από διαρρηγμένα κύτταρα εξαιτίας ιστικής βλάβης, χρόνιας φλεγμονής, κυτταρικής απόπτωσης ή νέκρωσης, ή από κύτταρα με μικρό χρόνο ημιζωής, όπως είναι τα αιμοπετάλια, β) ενεργή έκκριση μέσω μικροκυστιδίων, συμπεριλαμβανομένων των εξοσωμάτων (exosomes) και κυστιδίων εξωκύττωσης (Cocucci et al., 2009; Thery et al., 2002; Mathivanan et al., 2010; Ratajczak et al., 2006), και γ) ενεργή έκκριση μέσω ενός μονοπατιού εξαρτώμενου από μία RNA-binding protein, την HDL (Εικόνα 11) (Chen et al., 2012). Άλλες πρωτεΐνες που προσδένονται στο RNA, όπως η Argonaute2 (AGO2) και η νουκλεοπλασμίνη 1 (NPM1), έχει βρεθεί να προσελκύουν κυκλοφορούντα miRNAs (Chen et al., 2012).



Εικόνα 11. Μονοπάτια έκκρισης των miRNAs (Chen et al., 2012)

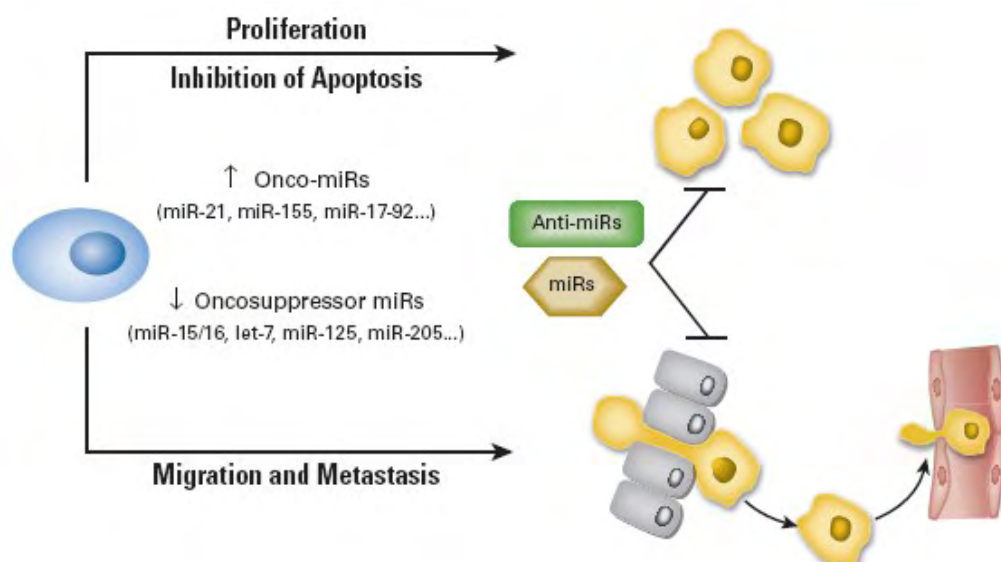
miRNAs και πρόγνωση του καρκίνου

Τα miRNAs αποδεικνύονται πιο χρήσιμα ως προγνωστικοί δείκτες, σε σχέση με τα mRNAs, χάρη στη σταθερότητα που παρουσιάζουν σε κλινικά δείγματα και στα ειδικά αποτυπώματα miRNAs που εντοπίζονται σε διαφόρους τύπους καρκίνων (Hayes et al, 2014). Ομάδα επιστημόνων βασίστηκε σε 43 έρευνες που πραγματοποιήθηκαν για 20 τύπους καρκίνου, από τις οποίες προέκυψαν τα miR-21(αυξάνεται στον καρκίνο) και let-7 (μειώνεται σε καρκίνο), τα οποία είναι τα πιο κοινά microRNAs που σχετίζονται με όλους τους τύπους καρκίνου. Το ογκογόνο miR-21 υπερεκφράζεται σε πολλούς καρκίνους, όπως είναι ο καρκίνος του μαστού, το γλοιοβλάστωμα, το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, ο καρκίνος του πνεύμονα, ο καρκίνος του στομάχου, ο καρκίνος του προστάτη και ο καρκίνος του παχέος εντέρου (Hayes et al, 2014). Συγκεκριμένα, υπερεκφρασμένα miR-21 σχετίζονται με κακή πρόγνωση (Calin et al., 2005). Στον καρκίνο του πνεύμονα για παράδειγμα, η έκφραση του let-7 ήταν μειωμένη και το γεγονός αυτό σχετίστηκε με μειωμένη μετεγχειρητική επιβίωση (Takamizawa et al., 2004).

Τα miRNAs ως θεραπευτικοί στόχοι

Η βιολογία των miRNAs μπορεί να αξιοποιηθεί θεραπευτικά ως στόχος φαρμάκων ή να αποτελέσουν τα ίδια φάρμακα (Lujambio and Lowe, 2012). Χάρης στην ικανότητα των miRNAs να στοχεύουν ταυτόχρονα πολλαπλά γονίδια και μονοπάτια που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική επιβίωση, η στόχευση ενός μεμονωμένου miRNA μπορεί να αποτελέσει μια «συνδυαστική» θεραπεία, η οποία θα εμποδίζει ανατροφοδοτικούς και αντισταθμιστικούς μηχανισμούς που μπορεί να περιορίζουν την αποτελεσματικότητα πολλών θεραπειών που βρίσκονται σε τρέχουσα εφαρμογή (Lujambio and Lowe, 2012).

Ογκογόνα miRNAs μπορούν να ανασταλούν με τη χρήση αντινοσηματικών ολογονουκλεοτιδίων, με τη χρήση antagomirs μορίων και της τεχνολογίας LNA (locked nucleic acid, LNA) (Εικόνα 12) (Garzon et al., 2010). Η χρήση της τεχνολογίας LNA χρίζει απροσδόκητης επιτυχίας in vivo, όχι μόνο στα ποντίκια, αλλά και για τη θεραπεία της ηπατίτιδας C σε εκτός του ανθρώπου πρωτεύοντα (Lanford et al., 2009).



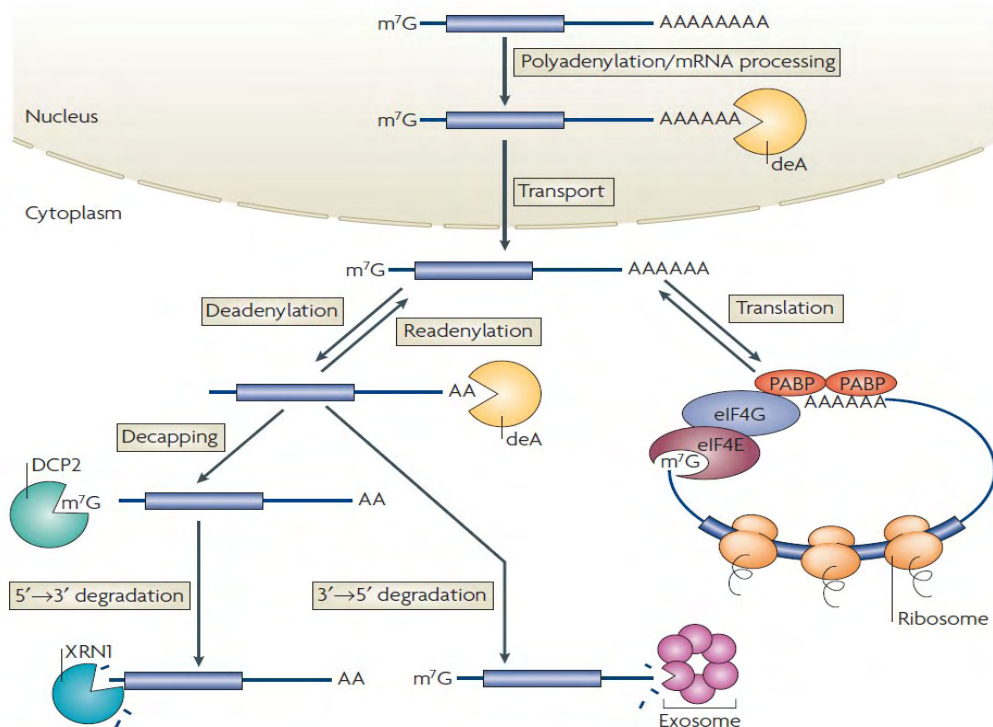
Εικόνα 12. Αναστολή λειτουργίας ογκογόνων miRNAs με εφαρμογή αντινοσηματικής τεχνολογίας (Iorio and Croce, 2009)

Μια άλλη στρατηγική εμπλέκει την αποκατάσταση της έκφρασης των ογκοκατασταλτικών miRNAs με εξωγενή συνθετικά miRNA- mimics ή διανομή τους με τη χρήση ιών (Garzon et al., 2010). Κατά κύριο λόγο, η χρήση miRNA μιμιδίων βασίζεται στη στόχευση ογκογόνων μεταγραφικών παραγόντων που είναι δύσκολο να στοχευτούν με παραδοσιακή χημειοθεραπεία (Lujambio and Lowe, 2012).

Σχετικά με τα μόρια αυτά, τα περισσότερα miRNA-μιμίδια και οι miRNA ανταγωνιστές, αποτελούν μόρια μήκους 6 νουκλεοτιδίων, τα οποία ασκούν τη δράση τους μέσα στο κύτταρο μέσω μίμησης ή αναστολής της 5' seed περιοχής της αλληλουχίας ενός miRNA, αφού διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη. Η τεχνολογία αυτή είναι πολλά υποσχόμενη, καθώς εξάλειψη έστω και μερικών μόνο καρκινικών κυττάρων, θα μπορούσε να οδηγήσει σε πρόληψη δημιουργίας μεταστάσεων και ίσως ακόμα και σε ύφεση του καρκίνου με αυξημένη βιωσιμότητα (Iorio and Croce, 2009).

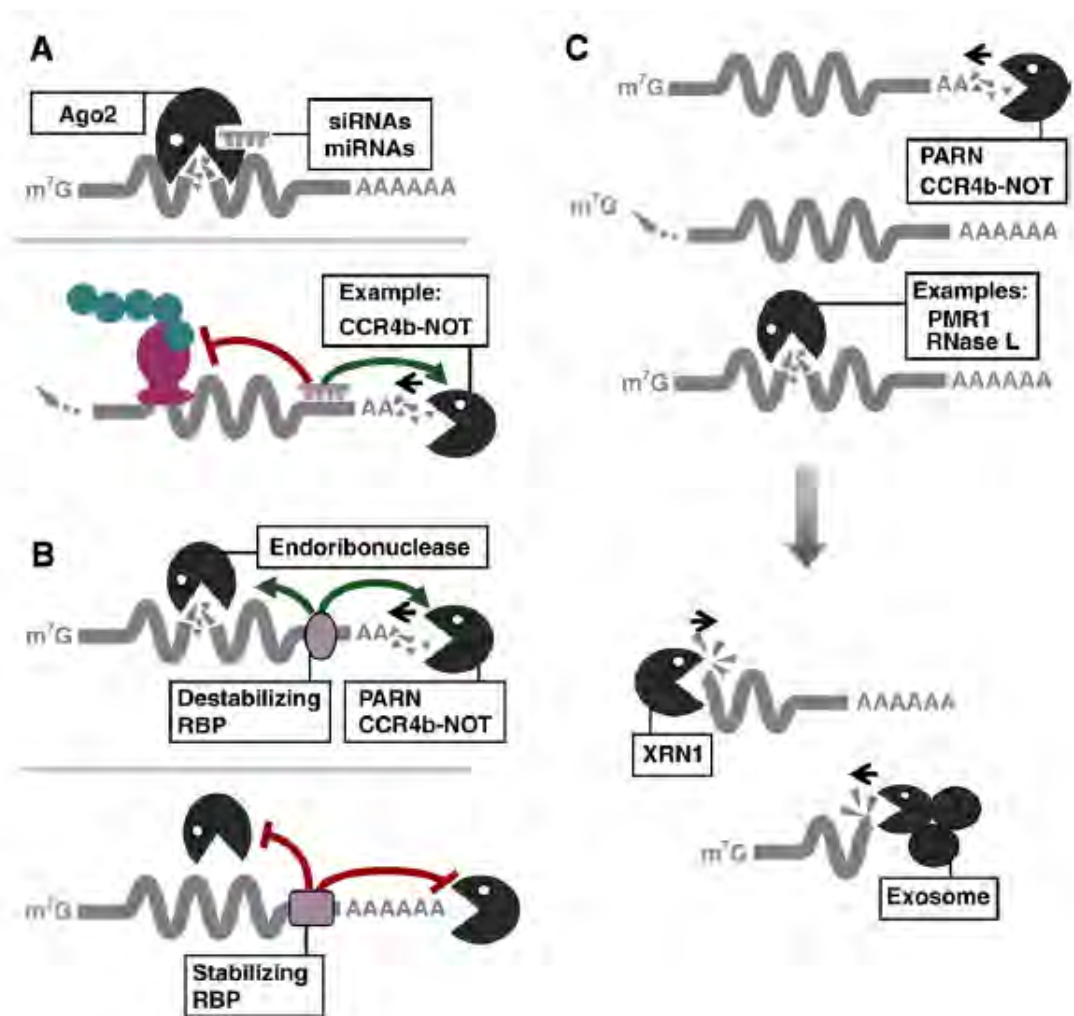
1.2. Απαδενυλίωση

Η απαδενυλίωση είναι το σημαντικότερο στάδιο που καθορίζει το ρυθμό της αποικοδόμησης και της μεταφραστικής αποσιώπησης του mRNA (Εικόνα 13). Το γεγονός αυτό καθιστά την απαδενυλίωση ως το κυριότερο σημείο ελέγχου για τις δύο αυτές διαδικασίες (Goldstrohm and Wickens, 2008).



Εικόνα 13. Η απαδενυλίωση είναι συνήθως το στάδιο που καθορίζει το ρυθμό της αποικοδόμησης και της αποσιώπησης του mRNA (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Η ρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs στα ευκαρυωτικά κύτταρα παρέχει έναν μηχανισμό ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης. Οι διαδικασίες με τις οποίες ελέγχεται η σταθερότητα ή η αποικοδόμηση των mRNAs διενεργούνται από cis-δραστικά στοιχεία, όπως είναι η πολυ (A) ουρά, η 5'-καλύπτρα και τα στοιχεία ARE (AU-rich elements), καθώς και από trans-δραστικούς παράγοντες, όπως είναι α) τα μη-κωδικά μόρια RNA (non-coding RNAs, ncRNAs), β) οι RNA - συνδεδεμένες πρωτεΐνες (RNA-binding proteins, RBPs) και γ) οι απαδενυλάσες, όπως φαίνεται και στην εικόνα 14 που ακολουθεί (Kim and Lee, 2009).



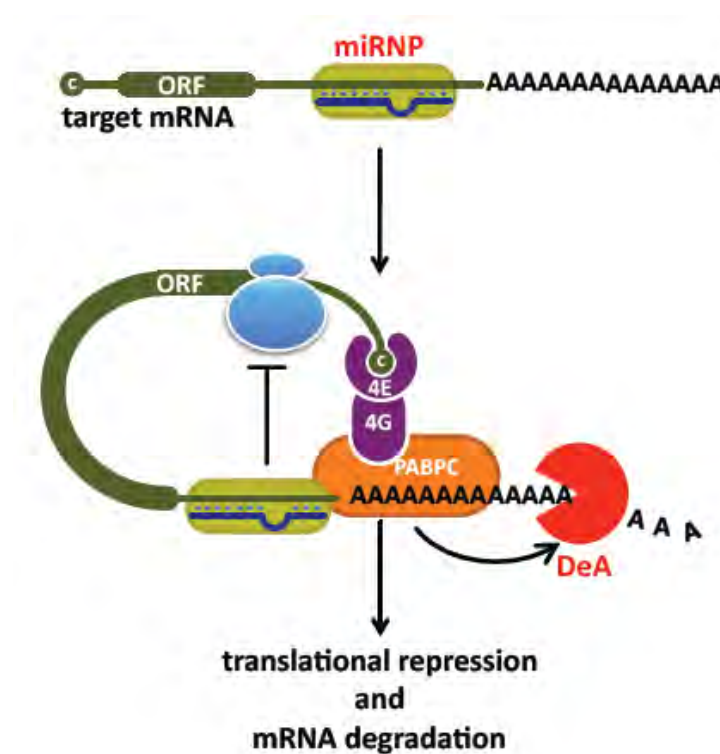
Εικόνα 14. Τρόποι δράσης trans-δραστικών παραγόντων όπως Α. μη κωδικά RNAs, Β. RNA-συνδεόμενες πρωτεΐνες (RBP) και Γ. ριβονουκλεάσες στη ρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs (Kim and Lee, 2009)

Απαδενυλίωση μέσω RNA- συνδεόμενων πρωτεϊνών

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι RNA-συνδεόμενες πρωτεΐνες (RNA-binding proteins, RBPs) μπορούν να επηρεάσουν δραματικά τη σταθερότητα των mRNAs (Kim and Lee, 2009). Η δράση αυτή έχει παρατηρηθεί σε μετάγραφα που κωδικοποιούν κυτταροκίνες ή πρωτο-ογκογονίδια, τα οποία φέρουν ARE αλληλουχίες στην 3'-αμετάφραστη περιοχή τους (3'-UTR) (Ross 1995). Οι RBPs μπορούν να προσδένονται στις 3'-αμετάφραστες περιοχές των mRNAs, αλλά και στην κωδική τους περιοχή και να τα προστατεύουν από τους μηχανισμούς αποικοδόμησης. Η ρυθμιστική ικανότητα των RBPs έγκειται στην ισορροπία μεταξύ της πυροδότησης ή της καθυστέρησης της αποικοδόμησης των mRNAs.

Απαδενυλίωση mRNA στόχων μέσω miRNAs

Η λειτουργία των μη-κωδικών μορίων RNA (ncRNAs) στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης επιτελείται μέσω του μηχανισμού RNAi. Η πρόσδεση ενός miRNA μέσω συμπληρωματικότητας στο mRNA στόχο, πυροδοτεί την έναρξη της αποικοδόμησής του από την υπομονάδα AGO του συμπλόκου RISC, η οποία έχει ενεργότητα ριβονουκλεάσης (Carthew and Sontheimer, 2009; Jonas and Izaurralde, 2015). Εναλλακτικά, η πρόσδεση ενός miRNA στο mRNA, προκαλεί τη στρατολόγηση απαδενυλασών, δηλαδή ενζύμων τα οποία επιτελούν την βράχυνση της πολύ (A) ουράς, που αποτελεί το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την αποικοδόμηση, ενώ παράλληλα καταστέλλεται και η μετάφραση του μεταγράφου (Εικόνα 14) (Carthew and Sontheimer, 2009). Η σύνδεση ανάμεσα στο miRISC σύμπλοκο και την απαδενυλίωση διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη GW182 (182 kDa), η οποία αλληλεπιδρά με τις AGO πρωτεΐνες και τις πρωτεΐνες πρόσδεσης στην πολύ (A) ουρά (PABP), και στρατολογεί τις τα σύμπλοκα απαδενυλίωσης PAN2-PAN3 (PAN) και CCR4-NOT, προωθώντας σταδιακή αφαίρεση των πολυ(A) ουρών των mRNA-στόχων (Kim et al., 1994; Miyoshi et al., 2010; Krol et al., 2010; Jonas and Izaurralde, 2015). Ο παράγοντας GW182 βρίσκεται σε πλειονότητα σε ενδοκυτταρικά κυστίδια, τα οποία ονομάζονται P-bodies (Eulalio et al., 2007). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τα miRNAs να συσσωρεύονται στα κυστίδια αυτά, όπου και ασκούν τη δράση τους (Miyoshi et al., 2010). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με ένα προτεινόμενο μοντέλο, η βράχυνση των πολυ(A) ουρών στο κυτταρόπλασμα, πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Στο πρώτο βήμα, μία σταδιακή βράχυνση της πολυ(A) ουράς στο 1/3 με 1/2 του αρχικού της μήκους ακολουθείται από ένα δεύτερο βήμα, όπου τα μήκη των πολύ (A) ουρών που προκύπτουν είναι εξαιρετικά ετερογενή. Η μετάβαση στη δεύτερο βήμα είναι κρίσιμη, διότι πυροδοτεί την αποικοδόμηση ολόκληρου του mRNA. Σ' αυτή τη διεργασία δύο σταδίων, η PAN2 καταλύει την βράχυνση της πολυ(A) ουράς στο πρώτο βήμα, ενώ το σύμπλοκο CCR4-NOT καταλύει το δεύτερο βήμα (Yamashita et al., 2005). Έτσι, καθώς προχωρά η απαδενυλίωση, όσο πιο κοντή η πολύ (A) ουρά, τόσο λιγότερες PABP πρωτεΐνες συνδέονται σ' αυτή, το οποίο με τη σειρά του οδηγεί στην μείωση της PAN2 και την μείωση της δραστηριότητας της CCR4, και το mRNA εισέρχεται στη δεύτερη φάση της απαδενυλίωσης, οδηγούμενο σε αποικοδόμηση (Yamashita et al., 2005). Η CCR4 θεωρείται αναπόσπαστο συστατικό της miRNA - μεσολαβούμενης απαδενυλίωσης, δρώντας ενορχηστρωμένα με την GW182 για την εκτόπιση της PABP από την πολύ (A) ουρά (Kim et al., 1994; Behm-Ansmant et al., 2006, Grimson et al., 2007).



Εικόνα 15. Αποικοδόμηση και/ ή καταστολή της μετάφρασης του mRNA-στόχου με τη μεσολάβηση miRNAs (Giannouli S. *et al.*, 2012)

Απαδενυλάσες

Ως απαδενυλάσες ορίζουμε τις Mg^{2+} - εξαρτώμενες εξωριβονουκλεάσες που αποικοδομούν την πολυ(A) ουρά των mRNAs με κατεύθυνση $3' \rightarrow 5'$, απελευθερώνοντας 5'-AMP (Goldstrohm and Wickens, 2008). Οι απαδενυλάσες είναι ένζυμα που εκδηλώνουν μια σαφή προτίμηση για 3'- πολύ (A) ως υπόστρωμα, παρά το γεγονός πως σε ορισμένες περιπτώσεις έχει δείχθει ότι αποικοδομούν λιγότερο αποτελεσματικά και μη-αδενοσινικά ομοπολυμερή (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Ο αριθμός των γνωστών απαδενυλασών έχει επεκταθεί πρόσφατα, κυρίως μέσω βιοχημικών και γενετικών μελετών. Υποψήφιες απαδενυλάσες έχουν ταυτοποιηθεί με χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής, ωστόσο η δράση τους δεν έχει αποδειχθεί (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Σύμφωνα με συγκριτικές μελέτες των περιοχών με συγκεκριμένα συντηρημένα κατάλοιπα στο καταλυτικό κέντρο των ενζύμων αυτών, όλες οι γνωστές απαδενυλάσες ανήκουν σε μία από της δύο ομάδες, την DEDD ή την εξωνουκλεάση-ενδονουκλεάση-φωσφατάση (EEP) υπέρ-οικογένεια (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Οι DEDD νουκλεάσες ονομάστηκαν έτσι εξαιτίας των συντηρημένων καταλυτικών αμινοξικών καταλοίπων Asp και Glu τα οποία είναι διάσπαρτα σε τρία μοτίβα εξωνουκλεάσης που δεσμεύουν ιόντα μαγνησίου (Goldstrohm and Wickens, 2008). Μέλη αυτής της ομάδας αποτελούν η απαδενυλάση POP2 (γνωστή και ως Caf1), η CAF1Z, η πολύ (A) - εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), καθώς και οι οικογένειες των PAN2 απαδενυλασών. Από την άλλη μεριά, η υπερ-οικογένεια των εξωνουκλεασών – ενδονουκλεασών - φωσφατασών (Exonuclease-Endonuclease-Phosphatase, EEP), περιλαμβάνει απαδενυλάσες που φέρουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στις δομικές περιοχές νουκλεάσης τους. Παραδείγματα EEP ενζύμων αποτελούν οι απαδενυλάσες CCR4, Nocturnin και Angel. Τα μέλη των οικογενειών POP2, CCR4, PAN2 και Angel είναι παρόντα σε όλους τους ευκαρυώτες, ενώ άλλες απαδενυλάσες είναι λιγότερο συντηρημένες (Goldstrohm and Wickens 2008).

Στον πίνακα 1 παρακάτω παρουσιάζεται συνοπτικά η κατάταξη των απαδενυλασών στις δύο υπερ-οικογένειες, καθώς και ενδεικτικά παραδείγματα ενζύμων που εντοπίζονται σε αντιπροσωπευτικά είδη οργανισμών.

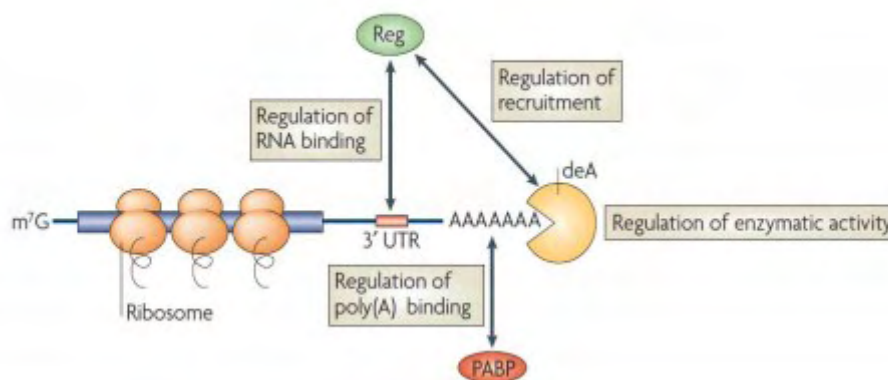
Πίνακας 1. Κατάταξη των απαδενυλασών στις δύο μεγάλες υπερ-οικογένειες και εντοπισμός τους σε αντιπροσωπευτικά είδη οργανισμών (Goldstrohm and Wickens, 2008).

		SC	CE	DM	XL	MM	HS
DEDD nucleases	CNOT7/POP2	+	+	+	+	+	+
	CNOT8	-	-	-	+	+	+
	CAF1Z	-	+	-	+	+	+
	PARN	-	+	-	+	+	+
	PAN2	+	+	+	+	+	+
EEP nucleases	CNOT6/CCR4	+	+	+	+	+	+
	CNOT6L	-	-	-	-	+	+
	NOC	-	-	+	+	+	+
	2'PDE	-	+	+	+	+	+

SC: *S.cerevisiae*, CE: *C. elegans*, DM: *D.melanogaster*, XL: *X.laevis*, MM: *M. musculus*, HS: *H.sapiens*,

Η ρύθμιση της δράσης των απαδενυλασών είναι αναγκαία, καθώς μη φυσιολογική απαδενυλίωση επιφέρει γενική απορρύθμιση (Goldstrohm and Wickens 2008). Σταθερά και μεταφραζόμενα mRNA πρέπει να προστατεύονται από την αφαίρεση της πολυ (A)

ουράς, ενώ μη σταθερά ή προβληματικά mRNA πρέπει να απαδενυλιώνονται και να αποικοδομούνται (Lejeune et al, 2003; Chen and Shyu, 2003). Ταχεία απαδενυλίωση συγκεκριμένων στόχων ξεχωρίζει σημαντικά από την φυσιολογική απαδενυλίωση. Έτσι οι απαδενυλάσες πρέπει να ρυθμίζονται γενικά αλλά και ειδικά σύμφωνα με τον στόχο (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Οι απαδενυλάσες ρυθμίζονται γενικά αλλά και ειδικά σύμφωνα με το στόχο (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Σύμφωνα με τους Goldstrohm and Wickens (2008), οι απαδενυλάσες και οι ρυθμιστές τους εκφράζονται σε δεδομένη χρονική στιγμή και τόπο ώστε να μπορεί να υπάρχει και η ρύθμιση τους. Άλλες απαδενυλάσες, όπως μέλη της POP2 και CCR4 οικογένειας εκφράζονται ευρέως και σταθερά. Ένας δεύτερος μηχανισμός για γενική ρύθμιση της απαδενυλίωσης είναι η αναστολή της ενζυμικής δράσης. Ειδικά στρεσογόνα, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, οξειδωτικά, οσμωτική πίεση ή θερμικό στρες, έλλειψη γλυκόζης αναστέλλουν την απαδενυλίωση, ενώ μελέτες επί της ανθρώπινης PARN δείχνουν ότι αναστέλλεται από νουκλεοτίδια και συνθετικά τους ανάλογα (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Η απαδενυλίωση επηρεάζεται από δύο τοπολογικά διακριτές μορφές ελέγχου: α) πυρηνική - κυτταροπλασματική και β) εντοπισμός σε κοκκία (Goldstrohm and Wickens, 2008; Lejeune et al, 2003). Διάφορες απαδενυλάσες κινούνται παλινδρομικά από τον πυρήνα στον κυτταρόπλασμα. Αλλαγές στη διαμερισματοποίηση επιφέρουν δραματικά αποτελέσματα. Στα αμφίβια, λύση του πυρήνα κατά τη μείωση απελευθερώνει την PARN στο κυτταρόπλασμα, όπου και απαδενυλιώνει μητρικά mRNA (Goldstrohm and Wickens, 2008). Διάφορες απαδενυλάσες εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικά κοκκία. Τα γαμετοκύτταρα, τα νευρωνικά κοκκία και τα σωμάτια P (P bodies) περιέχουν mRNA μόρια

σε καταστολή τα οποία μπορούν να ενεργοποιηθούν (Eulalio et al, 2007). Ο συνεντοπισμός των ενζύμων με τα υποστρώματα μπορεί να διεγείρει την απαδενυλίωση, αλλά αυτό δεν έχει αποδειχθεί πλήρως. Από την άλλη, η απαδενυλίωση δεν φαίνεται να περιορίζεται στα κοκκία γιατί οι ίδιες απαδενυλάσες έχουν βρεθεί και στο κυτταρόπλασμα (Conrad et al, 2007).

Ο ρυθμός της απαδενυλίωσης ποικίλλει μεταξύ των διάφορων mRNAs. Αυτή η διαδικασία μπορεί να επηρεάζεται από χαρακτηριστικά του mRNA (Goldstrohm and Wickens, 2008). Ρυθμιστικά στοιχεία που βρίσκονται συνήθως στις 3' αμετάφραστες περιοχές συγκεκριμένων mRNAs (3'-UTR) διαμεσολαβούν και ενισχύουν την απαδενυλίωση τους (Goldstrohm and Wickens, 2008). Αυτά τα στοιχεία αναγνωρίζονται από παράγοντες οι οποίοι στρατολογούν τις απαδενυλάσες προωθώντας έτσι την απαδενυλίωση.

Παραδείγματα παραγόντων που δεσμεύονται στις 3'-UTR περιοχές των mRNA, αποτελούν τα miRNAs και οι CUG-BP, PUF και CPEB πρωτεΐνες (Goldstrohm and Wickens 2008, Kadyrova et al., 2007; Hook et al., 2007). Εναλλακτικά, προώθηση της απαδενυλίωσης μπορεί να επιτευχθεί μέσω αλληλεπίδρασης της PABP πρωτεΐνης, η οποία αναγνωρίζει και προσδένεται στην πολύ (A) ουρά (Mitchell et al., 2001).

Επίσης, το 5' κάλυμμα του mRNA μπορεί να επηρεάσει θετικά την απαδενυλίωση διεγείροντας την δραστικότητα και την ικανότητα επεξεργασίας κάποιων απαδενυλασών (χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η PARN).

Οι απαδενυλάσες συνήθως αποτελούν τμήμα συμπλόκων. Οι παρακείμενες υπομονάδες, επηρεάζουν τη δραστικότητα των απαδενυλασών. Για παράδειγμα, η PAN2 δεσμεύεται στην PAN3, που με τη σειρά της αλληλεπιδρά με την PABP. Η τελευταία στρατολογεί το σύμπλοκο PAN2-PAN3 στην πολύ (A) ουρά των mRNA-στόχων (Hammet et al., 2002). Άλλες απαδενυλάσες σχηματίζουν ομοδιμερή και άλλες ετεροδιμερή. Ο ετεροδιμερισμός αυξάνει σημαντικά το ρεπερτόριο των συμπλόκων των απαδενυλασών που σχηματίζονται, καθώς διαφορετικά ετεροδιμερή έχουν και διαφορετικές ενζυμικές και ρυθμιστικές ιδιότητες. Η δυνατότητα για έλεγχο της απαδενυλίωσης καθίσταται τεράστια και ιδιαίτερα πολύπλοκη, λόγω της αλληλεπίδρασης των πολυάριθμων πιθανών συμπλόκων απαδενυλασών με την τεράστια ποικιλία των ρυθμιστών τους, και την αλληλεπίδραση των τελευταίων με μία εξίσου μεγάλη ποικιλία διαφορετικών ρυθμιστικών στοιχείων επί της 3'-UTR περιοχής των mRNA-στόχων (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Τα σύμπλοκα απαδενυλασών, που στρατολογούνται από ειδικούς ρυθμιστές, είναι πολυλειτουργικά καθώς περιέχουν, εκτός των ενζύμων απαδενυλίωσης, συστατικά που

καταστέλλουν τη μετάφραση και συστατικά που ενισχύουν την αποικοδόμηση του mRNA. Η πολυλειτουργικότητα αυτή παρέχει ευκαιρίες για πολυάριθμα σημεία ρύθμισης της απαδενυλίωσης, της μετάφρασης και της αποικοδόμησης των mRNAs, είτε ξεχωριστά είτε συντονισμένα (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Οι απαδενυλάσες, επιτελούν αρκετές βιολογικές λειτουργίες (Goldstrohm and Wickens, 2008). Κάποιες απαδενυλάσες είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα των οργανισμών (όπως είναι η PAN2 και η CCR4 σε yeast) (Tucker et al., 2001). Άλλες απαδενυλάσες, όπως είναι η PARN (*Xenopus laevis* και σε *A.thaliana*), η CCR4 (*D. melanogaster*) και η CCF-1 (*C.elegans*) είναι σημαντικές κατά την πρώιμη ανάπτυξη (Korner et al., 1998; Chiba et al., 2004; Reverdatto et al., 2004), ενώ άλλες απαιτούνται για τη γονιμότητα και τη μεταβολική ομοιόσταση (CNOT7 και Nocturnin σε ποντίκια) (Green et al., 2007). Τέλος, σε επίπεδο κυττάρου, οι απαδενυλάσες ρυθμίζουν την αύξηση του κυττάρου (όπως η Cnot6L σε θηλαστικά) (Goldstrohm and Wickens 2008).

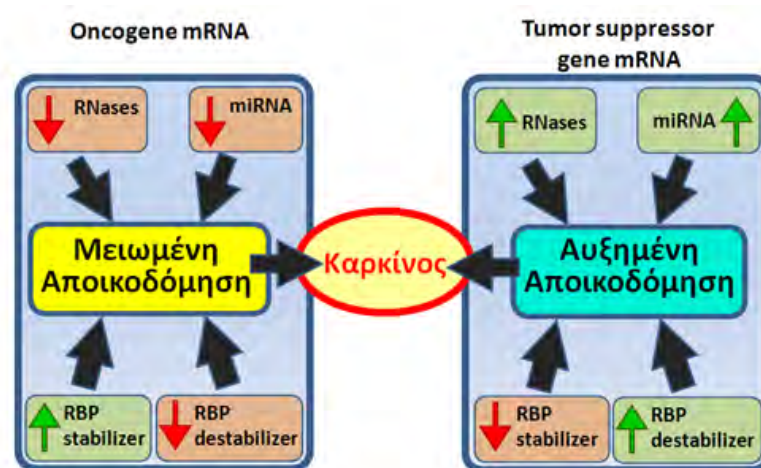
Απαδενυλάσες και miRNAs στον καρκίνο

Στον καρκίνο, η απορρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη σύνθεση των προϊόντων ογκογονιδίων ή/και μείωση των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών. Τα miRNAs και οι απαδενυλάσες είναι και οι δύο βασικοί παράγοντες που ελέγχουν την αφθονία των mRNAs, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Ο ρόλος των ριβοβουκλεασών, και συγκεκριμένα των απαδενυλασών διαφαίνεται καθοριστικής σημασίας για τη σταθερότητα των mRNAs. Μείωση της αποικοδόμησης των mRNAs σε παθολογικές καταστάσεις, μπορεί να απορρέει άμεσα μέσω υπερέκφρασης των παραγόντων που σταθεροποιούν το mRNA, ή μέσω υποέκφρασης των αποσταθεροποιητικών παραγόντων, όπως είναι οι απαδενυλάσες. Κάτι τέτοιο μπορεί να οδηγήσει σε μία επιμηκυμένη σταθερή κατάσταση των επιπέδων των ογκογόνων mRNAs, με αποτέλεσμα την πρόκληση του καρκίνου.

Σύμφωνα με τους Zhang et al (2015b), η μείωση της έκφρασης της πολύ (A) εξειδικευμένη ριβονουκλεάση PARN σε καρκινικά κύτταρα του στομάχου σταθεροποιεί το mRNA της p21, η οποία ανήκει στην οικογένεια Cip/Kip αναστολέων CDK, οδηγώντας έτσι στη στάση των κυττάρων στην G0/ G1 φάση του κυτταρικού κύκλου. Η PARN φαίνεται να αλληλεπιδρά με το mRNA της p21 μέσω της μεγάλης 3'UTR περιοχής του mRNA (Zhang et al., 2015b)

Αποσταθεροποιητικοί παράγοντες, εκτός από τις απαδενυλάσες, αποτελούν και τα miRNAs, είτε άμεσα μέσω στόχευσης των mRNAs και επακόλουθη ενδονουκλεολυτική

τμήση από το σύμπλοκο RISC, είτε έμμεσα μέσω της στρατολόγησης των απαδενυλασών στο σύμπλοκο miRNA/mRNA και επακόλουθη απαδενυλίωση και καταστολή της μετάφρασης. Έτσι, διαφοροποίηση των επιπέδων των απαδενυλασών αλλά και των miRNAs, μπορεί να συνεισφέρει στη δημιουργία του καρκίνου (Εικόνα 17).

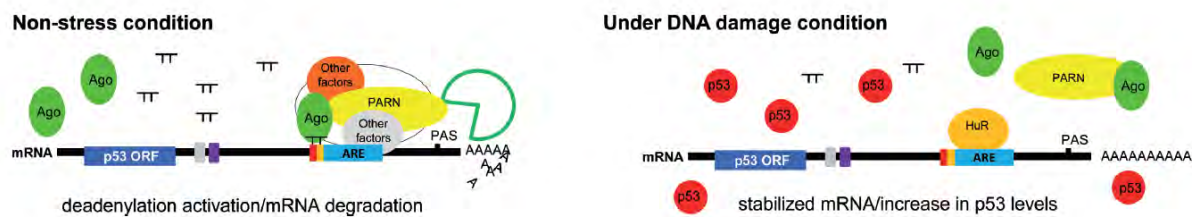


Εικόνα 17. Η απορυθμισμένη έκφραση των miRNAs και των απαδενυλασών μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη του καρκίνου (Kim and Lee, 2009)

Πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει μία άμεση συσχέτιση μεταξύ των απαδενυλασών και πρωτεϊνών που συνδέονται με miRNAs, όπως είναι η GW182 (Kuzuoglu-Ozturk et al., 2012), καθώς επίσης και εμπλοκή των απαδενυλασών σε οξείες λευχαιμίες (Maragozidis et al., 2012). Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν περαιτέρω τον πιθανό ρόλο των απαδενυλασών και των miRNAs στον καρκίνο, με τα τελευταία να αποτελούν μείζονα ρυθμιστικά μόρια και να έχει παγιωθεί η συμβολή τους στον καρκίνο (βλέπε Ενότητα 1.1. - miRNAs και καρκίνος). Το ενδιαφέρον στρέφεται στη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο αυτών παραγόντων, προκειμένου να προσδιοριστεί η συμβολή τους στον καρκίνο.

Διάφορες μελέτες υποδεικνύουν απαδενυλάσες που πιθανόν να εμπλέκονται στον καρκίνο, μέσω ρύθμισης ογκογονιδίων. Σύμφωνα με τους Zhang et al (2015a) η απαδενυλάση PARN σε διαφορετικές συνθήκες ρυθμίζει τα επίπεδα έκφρασης του TP53 mRNA, που κωδικοποιεί για τον καταστολέα του καρκίνου p53, μέσω μονοπατιών διαμεσολάβησης miRNA. Συγκεκριμένα οι Zhang et al. (2015a) αναφέρουν στην εργασία τους, ότι η πρωτεΐνη AGO 2, που αποτελεί βασικό συστατικό του miRISC συμπλόκου αποσιώπησης, σχηματίζει σύμπλεγμα με την PARN ενεργοποιώντας την δράση της ως απαδενυλάση (Εικόνα 18) (Zhang et al., 2015a). Η PARN ρυθμίζει το TP53 mRNA, όχι μόνο μέσω των ARE αλληλουχιών του, αλλά και μέσω μία παρακαείμενης θέσης – στόχου

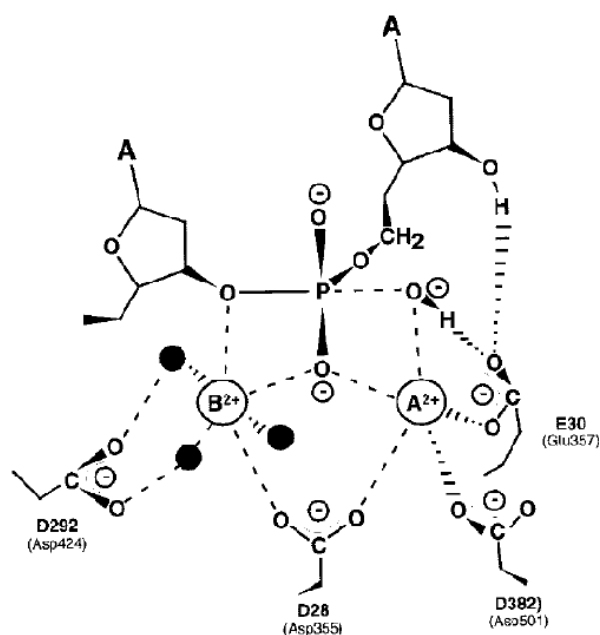
για τα miR-504/ miR-125b στην 3' αμετάφραστη περιοχή (UTR) του mRNA, όπου το miR-125b είναι υπεύθυνο για την στρατολόγηση της PARN στο miRISC (Zhang et al., 2015a).



Εικόνα 18. Η PARN συμμετέχει στην ρύθμιση της έκφραση του TP53 mRNA υπό διαφορετικές κυτταρικές συνθήκες (Zhang et al., 2015a)

Η πολυ (A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση PARN

Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση PARN αποτελεί μία ευκαρυωτική ριβονουκλεάση, η οποία υδρολύει κατάλοιπα αδενοσίνης από την πολυ(A) ουρά με κατεύθυνση 3'-5' και έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά άμεσα με τη δομή της 5'-καλύπτρας και με την πολυ(A) ουρά του mRNA (Dehlin et al., 2000; Gao et al., 2000; Martinez et al., 2000; Martinez et al., 2001). Η PARN είναι ένα ομοδιμερές ένζυμο, που έχει ενεργότητα εξαρτώμενη από δισθενή ιόντα Mg^{2+} , και απαιτεί ως υπόστρωμα μονόκλωνα πολύ (A) με ελεύθερη 3' υδροξυλ-ομάδα (Balatsos et al., 2012). Η PARN απελευθερώνει 5'-AMP κατά την απαδενυλίωση (Balatsos et al., 2012). Η PARN συνίσταται από 639 αμινοξέα, με προβλεπόμενο μοριακό βάρος 74 kDa (Balatsos et al., 2012). Το ένζυμο ανήκει στην υπερικογένεια DEDD των 3'-5' εξωριβονουκλεασών (Balatsos et al., 2012), οι οποίες μοιράζονται έναν συντηρημένο καταλυτικό πυρήνα, που περιέχει το DEDD μοτίβο, αποτελούμενο από τα τέσσερα καταλυτικά αμινοξέα: Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382, τα οποία είναι απαραίτητα για την καταλυτική ενεργότητα του ενζύμου. (Ren et al., 2002; Ren et al., 2004). Σύμφωνα με τους Ren et al. (2002) τα τέσσερα συντηρημένα αμινοξέα: Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382, αποτελούν βασικά κατάλοιπα του ενεργού κέντρου της PARN (Εικόνα 19), και σχηματίζουν δεσμούς με τα δισθενή ιόντα μετάλλων (π.χ. ιόντα Mg^{2+}). Επιπλέον, η His377 αποτελεί μέρος του καταλυτικού κέντρου και έτσι η PARN κατατάσσεται στις εξωνουκλεάσες DEDDh (Wu et al., 2005).



Εικόνα 19. Σχηματικό μοντέλο του ενεργού κέντρου της PARN (Ren et al., 2002).

Μελέτες έχουν δείξει δύο επιπλέον διακριτά βιοχημικά χαρακτηριστικά της PARN: τον επεξεργαστικό τρόπο δράσης της και την επίδραση στην ενεργότητα απαδενυλάσης από την 5'-m7G-καλύπτρα (Dehlin et al., 2000; Gao et al., 2000, Martinez et al., 2000; Martinez et al., 2001). Η «επεξεργαστικότητα» αναφέρεται σε μια ενζυμική ενεργότητα που επιτελεί επανειλημμένως την ίδια αντίδραση χωρίς το ένζυμο να αποσπάται από το σύμπλοκο με το υπόστρωμά του, σε κάθε κύκλο κατάλυσης (Nossal and Singer, 1968). Έχει προταθεί ότι η PARN θα μπορούσε να επηρεάζει την έναρξη της μετάφρασης μέσω παρεμβολής στην κυκλοποίηση μεταξύ 5'-καλύπτρας — eIF4E/eIF4G — πολυ(A) ουράς, αλλά και την αποικοδόμηση των mRNAs, μέσω απαδενυλίωσης (Virtanen et al., 2013).

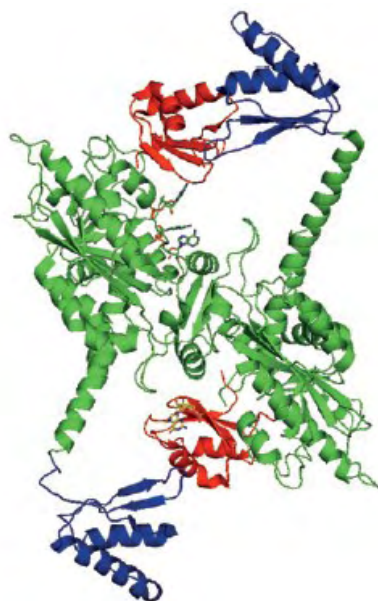
Όσον αφορά τη δομή της PARN, ο καταλυτικός πυρήνας της (1-177aa και 246-391aa) σχηματίζει μία αρνητικά φορτισμένη κοιλότητα, η οποία εντοπίζεται σε μία επικράτεια, επονομαζόμενη ως επικράτεια νουκλεάσης (Korner et al., 1998; Ren et al., 2002; Wu et al., 2005). Παράλληλα με την επικράτεια νουκλεάσης, δύο άλλες νουκλεάσες με RNA-συνδεδεμένες ιδιότητες, έχουν προσδιοριστεί στην PARN, το μοτίβο αναγνώρισης RNA (437aa-510aa), RRM (Copeland and Wormington, 2001; Monecke et al., 2008; Nagata et al., 2008; Nilsson et al., 2007; Wu et al., 2009) και το μοτίβο αναγνώρισης RNA (178aa-245aa), αναφερόμενο ως επικράτεια R3H (Wu et al., 2005). Η RRM επικράτεια απαιτείται για την πρόσδεση της 5'-m7G-καλύπτρας (Nilsson et al., 2007), ενώ η R3H για την σύνδεση της PARN στην πολυ(A) ουρά (Wu et al., 2005). Επίσης, έχει προταθεί, ότι η RRM επικράτεια σταθεροποιεί τη συνολική τρισδιάστατη δομή της PARN (Zhang et al.,

2007). Οι περιοχές των επικρατειών και τα αμινοξέα λειτουργικής σημασίας φαίνονται στην εικόνα 20.



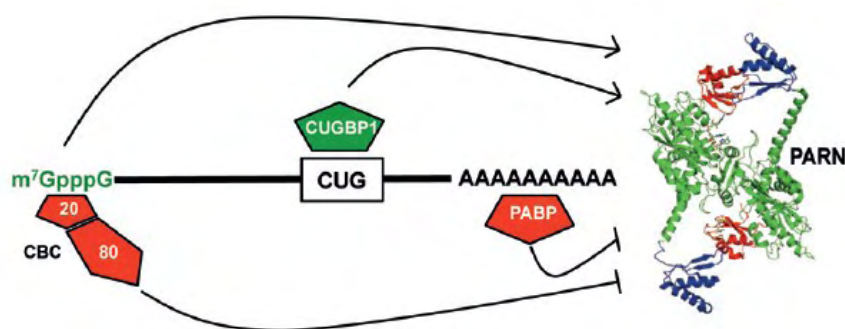
Εικόνα 20. Σχηματική αναπαράσταση των επικρατειών της ανθρώπινης απαδενυλάσης PARN (639 αα), όπου με πράσινο χρώμα αναπαρίσταται η επικράτεια ριβονουκλεάσης, με μπλε η επικράτεια R3H, με κόκκινο η επικράτεια RRM, και με λευκό η μη συντηρημένη καρβοξυτελική περιοχή. Αναπαρίστανται επίσης και τα λειτουργικώς σημαντικότερα αμινοξέα της πρωτεΐνης (Virtanen *et al.*, 2013)

Η PARN σχηματίζει ένα στενά συνδεδεμένο ομοδιμερές, οι υπομονάδες του οποίου συγκρατούνται μεταξύ τους μέσω μιας πλούσιας σε αρωματικά αμινοξέα διεπιφάνειας και από έναν δισουλφιδικό δεσμό (...S—S...) που ενώνει τις δύο επικράτειες νουκλεάσης της PARN (Εικόνα 21) (Martinez *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2009; Niedzwiecka *et al.*, 2011). Έχει δειχθεί ότι ο διμερισμός αυτός είναι ζωτικής σημασίας για την ικανότητα κατάλυσης της PARN (Wu *et al.*, 2005).



Εικόνα 21. Τρισδιάστατη διμερή δομή της ανθρώπινης απαδενυλάσης PARN, όπου με πράσινο χρώμα αναπαρίσταται η δομή που προκύπτει από την επικράτεια ριβονουκλεάσης, με μπλε η δομή από την επικράτεια R3H, και με κόκκινο η δομή από την επικράτεια RRM (Virtanen *et al.*, 2013)

Το τμήμα του mRNA που αποτελεί την 5'- m⁷G-καλύπτρα μπορεί να θεωρηθεί ως ένας αλλοστερικός ρυθμιστής της ενεργότητας της PARN διότι: α) η 5'- m⁷G-καλύπτρα των πουαδενυλιωμένων mRNA υποστρωμάτων επηρεάζει τον ρυθμό αποικοδόμησης της πολύ (A) ουράς από την PARN (Dehlin et al., 2000; Gao et al., 2000; Martinez et al., 2000; Martinez et al., 2001), μέσω της ενίσχυσης της επεξεργαστικότητας του ενζύμου (Martinez et al., 2001), και β) λόγω της θέσης πρόσδεσης της 5'- m⁷G-καλύπτρας (Wu et al., 2009), η οποία βρίσκεται εκτός του καταλυτικού κέντρου της PARN. Η ρύθμιση της PARN φαίνεται να επιτελείται εκτός από την 5'- m⁷G-καλύπτρα και την 3'-πολυ(A) ουρά, και από άλλα cis-δραστικά στοιχεία, όπως είναι τα στοιχεία AU και GU (Εικόνα 22) (Balatsos et al. 2012; Garneau et al., 2007; Goldstrohm & Wickens, 2008; Parker & Song, 2004; Zhang et al., 2010).



Εικόνα 22. Ρύθμιση της πρωτεΐνης PARN μέσω RNA-συνδεόμενων πρωτεϊνών (Virtanen et al., 2013)

Στα στοιχεία αυτά προσδένονται διάφορες RNA-συνδεόμενες πρωτεΐνες, οι οποίες ενισχύουν ή αναστέλλουν τη δράση της PARN. Στο κυτταρόπλασμα το σύμπλοκο CBC, αντικαθίσταται στο mRNA, από τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4E (Marcotrigiano et al., 1997), ο οποίος αποτελεί τμήμα του eIF4F συμπλόκου, που είναι ζωτικής σημασίας για την αποτελεσματική έναρξη της μετάφρασης στους ευκαρυώτες. Τόσο το CBC όσο και ο eIF4E προσδένουν το κάλυμμα στο 5' και ανταγωνίζονται με την PARN (Seal et al., 2005; Balatsos et al., 2006). Η πρόσδεση της πρωτεΐνης PABP στην πολυ (A) ουρά επίσης αναστέλλει την ενεργότητα της PARN (Εικόνα 20). Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί με τον σχηματισμό του PABP/poly(A) συμπλόκου, που παρεμβαίνει στην αλληλεπίδραση των απαδενυλασών με το πολυ(A) υπόστρωμα (Bernstein et al., 1989; Copeland & Wormington, 2001; Ford et al., 1999; Ford and Wilusz, 1999; Kim and Richter, 2007; Wormington et al., 1996).

Η PARN εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα, όμως μέσω παλινδρομικής κίνησης μπορεί και μετακινείται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (Yamashita et al., 2005; Uhlen et al., 2010) ενώ στον πυρήνα, βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στα nucleoli and Cajal bodies (Berndt et al., 2012).

Η PARN συμμετέχει σε μια σειρά κυτταρικών μηχανισμών και αποκρίσεων. Για παράδειγμα, έχειδειχθεί ότι η PARN εμπλέκεται σε κυτταρική απόκριση στο στρες (Cevher et al., 2010; Reinhardt et al., 2010), στην μεταφραστική αποσιώπηση των μητρικών mRNAs κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των ωοκυττάρων του *Xenopus laevis* (Korner et al., 1998) και στην ταχεία απαδενυλίωση των mRNAs που περιέχουν στοιχεία πλούσια σε AU (ARE) (Lai et al, 2003). Επίσης, έχει προταθεί ως ένας πιθανός δείκτης της καρκινικής ανάπτυξης (Maragozidis et al., 2012).

Η πιθανή εμπλοκή της PARN σε διεργασίες όπως είναι η καρκινογένεση διαφαίνεται από τα παρακάτω δεδομένα. Πολλά mRNAs τα οποία περιέχουν τα στοιχεία ARE (πλούσια σε AU κατάλοιπα), αποτελούν πρωτο-ογκογονίδια (π.χ. c-myc, c-fos και c-jun), κυτταροκίνες (π.χ. TNFα), χυμοκίνες, αυξητικούς παράγοντες και ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (Schoenberg and Maquat, 2012; Wilusz et al., 2001; Wu and Brewer, 2012). Τα εν λόγω mRNAs, ρυθμίζονται από τις ARE-συνδεόμενες πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν εμπλακεί σε διεργασίες δρώντας ως ενεργοποιητές ή πρωτεΐνες στρατολόγησης της PARN (Lai et al., 1999; Lai et al., 2000; Lai et al., 2003). In silico μελέτες έχουν αποκαλύψει πως διαφοροποιείται η έκφραση των τεσσάρων απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT7 και NOC σε καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα (Maragozidis et al. 2015) καθώς επίσης και σε οξείες λευχαιμίες (Maragozidis et al. 2012). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η PARN απορρυθμίζεται σε ιστούς γαστρικού καρκίνου (Zhang et al, 2015b).

Παράλληλα με τα παραπάνω, η ενεργότητα απαδενυλίωσης της PARN, συνδυασμένη με την αποσταθεροποιητική ικανότητα των RBPs, μπορεί να δράσει δυνητικά ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας, προκαλώντας αποικοδόμηση των mRNAs που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες, όπως είναι η IL-8 και ο VEGF. Το γεγονός αυτό αποκαλύφθηκε κατά τη διερεύνηση του ρόλου μιας ελαττωματικής αποσταθεροποιητικής RBP πρωτεΐνης, της TTP (Tristetraprolin), η οποία δεν μπορούσε να στρατολογήσει την PARN σε κακοήγη γλειοκύτταρα (Lai et al. 2003).

Πρόσφατα, οι Zhang et al (2015a) αναφέρουν, ότι η απαδενυλάση PARN ρυθμίζει τα επίπεδα έκφρασης του TP53 mRNA, που κωδικοποιεί για τον καταστολέα του καρκίνου

p53, μέσω μονοπατιών διαμεσολάβησης miRNA. Έτσι, η PARN συμπεριλαμβάνεται στις απαδενυλάσες που αποικοδομούν mRNAs κατευθυνόμενες από microRNAs.

Μια σημαντική παρατήρηση ήταν ότι η PARN δεν εμπλέκεται αποκλειστικά μόνο στη ρύθμιση της αποικοδόμησης των mRNAs, αλλά συμμετέχει επίσης και στα τελευταία στάδια της βιογένεσης μη-κωδικών μορίων RNA, όπως είναι το microRNA, miR-451 (Yoda et al., 2013). Επίσης, τα snoRNAs και τα scaRNAs είναι κρίσιμα για την τροποποίηση μη-κωδικών μορίων, όπως είναι τα ριβοσωμικά rRNAs και τα μικρά U πυρηνικά snRNAs του συμπλόκου ματίσματος (Kiss et al., 2010, Matera et al., 2007). Φαίνεται ότι η απαδενυλίωση από την PARN αποτελεί σημαντικό βήμα για τον έλεγχο της αφθονίας και την ωρίμανση των sno/scaRNA μορίων (Berndt et al. 2012). Η παρατήρηση ότι η PARN εμπλέκεται και στην βιογένεση μη-κωδικών μορίων, κατέδειξε την PARN ως κάτι περισσότερο από μια απαδενυλάση η οποία εξελίχθηκε για τον έλεγχο των ευκαρυωτικών mRNA, αλλά ότι μπορεί να εμπλέκεται και σε άλλες κυτταρικές διεργασίες. Η PARN επιτελεί αρκετούς εξειδικευμένους ρυθμιστικούς ρόλους. Οι Moon et al (2015) στην εργασία τους αναφέρουν, πως μεταλλάξεις στο γονίδιο της PARN προκαλούν ασθένειες των τελομερών, όπως είναι η οικογενής ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση και η συγγενής δυσκεράτωση, καθώς η PARN απαιτείται για την ωρίμανση του 3' άκρου του RNA συστατικού της τελομεράσης (TERC). Συγκεκριμένα, η PARN χρειάζεται για την μετα-μεταγραφική αφαίρεση της πολύ (A) ουράς από τα αρτιγενή μετάγραφα TERC, οδηγώντας στην ωρίμανση του 3' άκρου τους και την προστασία τους από αποικοδόμηση με το εξώσωμα (Moon et al, 2015).

Εκτός από το ρόλο της σε τελικά στάδια ωρίμανσης, προκαταρκτικές μελέτες του εργαστηρίου με μικροσυστοιχίες microRNAs δείχνουν πως η PARN καθορίζει τη σταθερότητα μιας ομάδας microRNAs, καθώς επίσης και πως παίζει ρόλο στην βιοσύνθεση των miRNAs, πιθανόν σε πολύ αρχικό στάδιο, όπου τα πρώιμα miRNAs (pri-miRNAs) λαμβάνουν την πολυ(A) ουρά (Kyritsis et al., *in preparation*).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η PARN συμβάλλει στα τελικά στάδια της ωρίμανσης των microRNAs. Παρατηρήσεις από το εργαστήριό μας δείχνουν πως επηρεάζει τα επίπεδα μιας ομάδας microRNAs και είναι πιθανό να συμβάλλει στην ωρίμανσή τους σε πρώιμο στάδιο. Σκοπός της εργασίας είναι να εξεταστεί ο ρόλος της PARN στα επίπεδα έκφρασης microRNA. Στο πλαίσιο αυτής της προσπάθειας, κατασκευάσαμε με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση το καταλυτικά ανενεργό μετάλλαγμα PARN E30A, στο οποίο το γλουταμινικό στη θέση 30 έχει αντικατασταθεί με μία αλανίνη (E30A). Ακολούθως, στόχος είναι να εξεταστούν τα επίπεδα έκφρασης δύο επιλεγμένων microRNAs μετά από υπερέκφραση τόσο της PARN wt, όσο και της PARN E30A στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά από καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα (NCI-H520) με τη χρήση επαγωγίμου από τετρακυκλίνη συστήματος γονιδιακής έκφρασης. Εξετάζονται τα επίπεδα έκφρασης των pri-miRs (pri-miR-29a, pri-miR-1207) και miRs (miR-29a, miR-1207) στα εκχυλίσματα των παραπάνω κυττάρων με qRT-PCR.

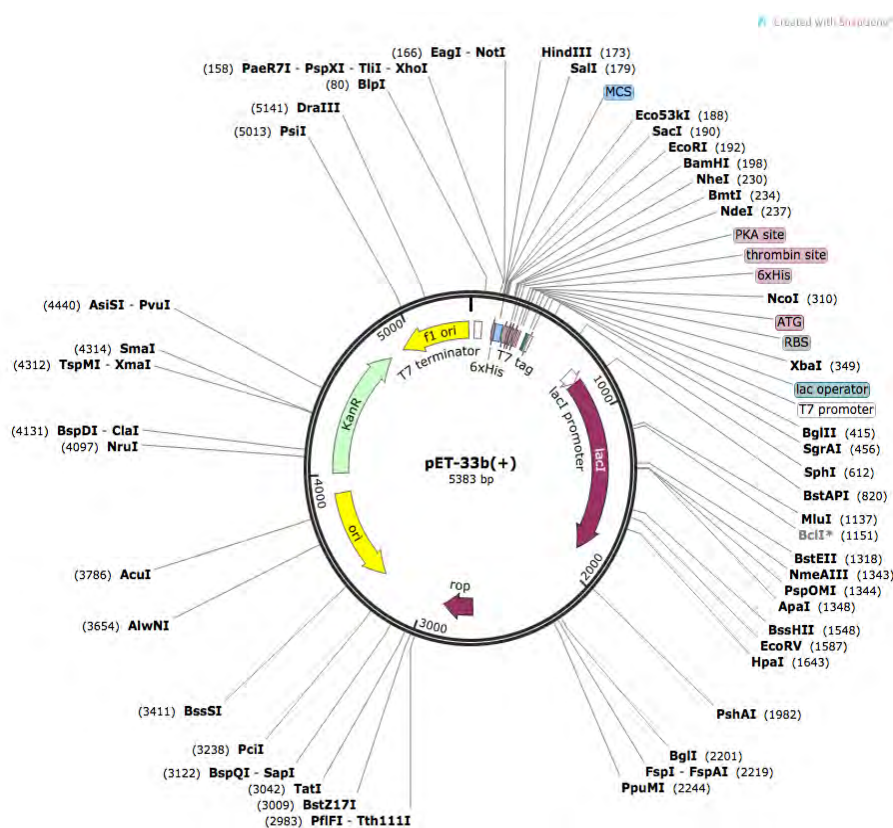
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο παράρτημα υπάρχει αναλυτική λίστα με τα θρεπτικά υλικά, τα χημικά, τα διαλύματα και τα Kits που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες της παρούσας εργασίας.

3.1 Στοχευμένη μεταλλαξιγένεση

Σύνθεση της μεταλλαγμένης αλληλουχίας της PARN E30A

Για να δημιουργηθεί το μετάλλαγμα PARN E30A, χρησιμοποιήθηκε το cDNA της PARN WT, το οποίο ήταν τοποθετημένο στο πλασμίδιο pET-33 b, μήκους 5.383 bp. Ο χάρτης του εν λόγω πλασμιδίου φαίνεται στην εικόνα 1. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μία σημειακή μετάλλαξη, κατά την οποία το νουκλεοτίδιο αδενίνη (A) της τριπλέτας GAG, που κωδικοποιεί το αμινοξύ Γλουταμίνη (Glu) στη θέση 30 του ενεργού κέντρου της PARN, αντικαταστάθηκε με μία κυτοσίνη (C), με αποτέλεσμα να προκύπτει η τριπλέτα GCG, που κωδικοποιεί το αμινοξύ Αλανίνη (Ala).



Εικόνα 1: Πλασμιδιακός φορέας pET-33 b

Το cDNA της PARN αγρίου τύπου (WT) έχει αλληλουχία νουκλεοτιδίων μήκους 1920 bp, και είναι η εξής παρακάτω:

```
ATGGAGATAATCAGGAGCAATTTTAAGAGTAATCTTCACAAAGTGTACCAGGCCATAGAGGAGGCCGACTTCT
TCGCCATCGATGGGGAGTTTTTCAGGAATCAGTGATGGACCTTCAGTCTCTGCATTAAACAAATGGTTTTTGACAC
TCCAGAAGAGAGGTATCAGAAGCTTAAAAAGCATTCATGGACTTTTTTGCTATTTTCAGTTTGCCCTTTGCACT
TTTAAGTATGACTACACAGATTCAAAGTATATAACGAAGTCATTTAACTTCTATGTTTTCCCGAAACCCCTTCA
ATAGATCCTCACCAGATGTCAAATTTGTTTGTGTCAGAGCTCCAGCATTGACTTTCTAGCAAGCCAGGGATTTGA
TTTTAATAAAGTTTTTCGAAATGGAATTCATATTTAAATCAGGAAGAAGAAAGACAGTTAAGAGAGCAGTAT
GATGAAAAACGTTTCACAGGCGAATGGTGCAGGAGCTCTGTCCTATGTATCTCCTAACACTTCAAAATGTCCTG
TCACGATTCTGAGGATCAAAAGAAGTTTTATTGACCAAGTGGTAGAGAAAAATAGAGGATTTATTACAAAGTGA
AGAAAAACAAGAACTTGATTTAGAGCCATGTACCGGGTTCCAAAGAAAACTAATTTATCAGACTTTGAGCTGG
AAGTATCCGAAAGGCATTCATGTTGAGACTTTAGAAACTGAAAAGAAGGAGCGATATATAGTTATCAGCAAAG
TAGATGAAGAAGAACGCAAAAGAAGAGAGCAGCAGAAACATGCCAAAGAACAGGAGGAGCTGAATGATGCTGT
GGGATTTTCTAGAGTCATTCACGCCATTGCTAATTCGGGAAAACTTGTATTGGACACAATATGCTCTTGAC
GTCATGCACACAGTTTCATCAGTTCTACTGCCCTCTGCCTGCGGACTTAAGTGAGTTTAAAGAGATGACAACAT
GTGTTTTTCCCAGACTCTTGATACTAAATTGATGGCCAGCACACAACCTTTTAAAGGATATCATTAACAACAC
ATCCCTTGCGGAATTGGAAGCGGTTAAAAGAGACACCTTTCAACCCTCCTAAAAGTTGAAAGTGCCGAAGGT
TTTCCAAGTTATGACACAGCCTCTGAACAACCTCCACGAGGCAGGCTACGATGCCTACATCACAGGGCTGTGCT
TCATCTCCATGGCCAATTACCTAGGTTCTTTTCTCAGCCCTCCAAAAATTCATGTGTCTGCCAGATCAAACT
CATTGAACCTTTTTTTTAAACAAGTTATTTCTTATGAGGGTCATGGATATCCCCTATCTAAACTTGGAAGGACCA
GACTTGCAGCCTAAACGTGATCATGTTCTCCATGTGACATTCCCCAAAGAATGGAAAACCAGCGACCTTTACC
AGCTTTTTCAGTGCCTTTGGTAACATTTCAGATATCCTGGATTGATGACACATCAGCATTTGTTTTCCCTTAGCCA
GCCCAGCAAGTAAAGATTGCTGTCAATACCAGCAAATATGCAGAAAGCTATCGGATCCAAACCTATGCTGAA
TATATGGGGAGAAAACAGGAAGAGAAGCAGATCAAAAGAAAGTGGACTGAAGATAGCTGGAAGGAGGCTGACA
GCAAACGGTTAAACCCCCAGTGCATACCCTACACCCTGCAGAATCACTATTACCGCAACAATAGTTTTACAGC
TCCCAGCACAGTAGGAAAGAGAAATTTGAGTCCTAGTCAAGAGGAAGCTGGCCTGGAGGACGGAGTGTGAGG
GAGATTTCCGACACTGAGCTTGAGCAGACCGATTCTGTGTCAGAGCCCCCTCTCAGAGGGAAGGAAAAAGGCCA
AGAAATTAATAAAGAATGAAGAAGGAGCTTTCTCCAGCAGGAAGCATCTCGAAGAACAGCCCTGCCACACTCTT
TGAAGTTCCTGACACATGGTAA
```

Πρωτόκολλο στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης

Στην παρούσα εργασία βασιστήκαμε στο πρωτόκολλο μεταλλαξιγένεσης QuikChange II Site-Directed Mutagenesis, της εταιρείας Stratagene. Έτσι λοιπόν ακολουθήθηκαν τα εξής παρακάτω βήματα:

Βήμα 1^ο) Σχεδιάστηκαν οι εκκινητές με το online πρόγραμμα PrimerX και επιλέχθηκε το παρακάτω ζεύγος εκκινητών, το οποίο πληροί τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, όπως αυτά αναφέρονται στον πίνακα 1:

*

Forward: 5' CGCCATCGATGGGGCGTTTTTCAGGAATC 3'
Reverse: 5' GATTCTGAAAACGCCCCATCGATGGCG 3'

*

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά βάσει των οποίων σχεδιάστηκαν οι εκκινητές μεταλλαξιγένεσης

Κριτήρια επιλογής εκκινητών μεταλλαξιγένεσης
Length: 28 bp GC content: 57.14% Melting temp: 76.8°C Location: 75-102 Mismatched bases: 1 Mutation: Substitution 5' flanking region: 14 bp 3' flanking region: 13 bp

Βήμα 2^ο) Πραγματοποιήθηκε μία αντίδραση PCR για τη σύνθεση της μεταλλαγμένης κωδικής και μη κωδικής αλυσίδας της PARN E30A, όπου οι ποσότητες των επιμέρους αντιδραστηρίων και οι συνθήκες θερμικού προφίλ παρουσιάζονται αναλυτικά στους παρακάτω πίνακες 2 και 3.

Πίνακας 2. Ενίσχυση της κωδικής και μη κωδικής αλυσίδας της PARN E30A

25 µl of KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR (2X) 1,5 µl (~50 ng) of dsDNA template 1,3 µl (100 pmol/µl) of forward mutant primer 1,3 µl (100 pmol/µl) of reverse mutant primer ddH ₂ O to a final volume of 50 µl

Πίνακας 3. Θερμικό προφίλ ενίσχυσης της κωδικής και μη κωδικής αλυσίδας της PARN E30A

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95	3 min	10 κύκλοι αντίδρασης
Αποδιάταξη	98	20 sec	
Υβριδοποίηση	65	1 min	
Επέκταση	72	8 min	

Βήμα 3^ο) Επώαση του προϊόντος της PCR αντίδρασης με το ένζυμο περιορισμού Dpn 1 (10 U/μl) για 5 ώρες στους 37^ο C, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η πέψη του μεθυλιωμένου ή ημιμεθυλιωμένου πατρικού DNA. Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται τα επιμέρους συστατικά της αντίδρασης πέψης με Dpn1.

Πίνακας 4. Τα επιμέρους συστατικά της αντίδρασης πέψης με Dpn1

Dpn1	1 μl	37 ^ο C/ 5h
10x Buffer 4	5 μl	
Προϊόν της PCR	44 μl	
Υπελ	50 μl	

Χημικός μετασχηματισμός δεκτικών XL1-Blue κυττάρων (transformation)


















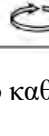
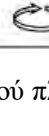

Σε 100μl επιδεκτικών XL1-Blue κυττάρων γίνεται προσθήκη 5μl του πλασμιδίου pET-33 b, που φέρει το μετάλλαγμα PARN E30A, μετά την κατακρήμνιση με αιθανόλη. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται επώαση στον πάγο για 30min και ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42^ο C για 45 δευτερόλεπτα (sec). Έπειτα τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 1-2 λεπτά (min) και εν συνεχεία προστίθενται σε κάθε καλλιέργεια 900μl LB broth. Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στους 37^ο C υπό ανάδευση (160-210 rpm). Τέλος, επιστρώνονται 100μl της μετασχηματισμένης καλλιέργειας σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB agar το οποίο περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό (καναμυκίνη), ανάλογα με τα γονίδια ανθεκτικότητας που διαθέτει το εκάστοτε πλασμίδιο που χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό. Τέλος, πραγματοποιείται επώαση των τρυβλίων στους 37^ο C για 12-14 ώρες. Την επομένη, εφόσον υπάρχουν διακριτές αποικίες, ενοφθαλμίζουμε σε 5ml LB Broth με 5 μl αντιβιοτικού (καναμυκίνη) μία αποικία. Το επωάζουμε ο/η στους 37^ο C και 210 rpm. Δημιουργούμε stock από την συγκεκριμένη καλλιέργεια χρησιμοποιώντας 700μl της καλλιέργειας και 200μl γλυκερόλης αποστειρωμένης (αποθήκευση στους -80^ο C).

Δημιουργία μικρών καλλιεργειών

Σε ένα αποστειρωμένο φάλλον προστίθεται 10ml LB Broth και 10μl του αντιβιοτικού καναμυκίνη. Με το tip της πιπέτας παραλαμβάνονται από το stock κυττάρων λίγα και ενοφθαλμίζονται στο φάλλον. Τοποθετούνται για επώαση ο/η στους 37^ο C και 210 rpm.

Καθαρισμός πλασμιδίου

Ο καθαρισμός του πλασμιδίου pET-33 b, που φέρει το μετάλλαγμα PARN E30A, πραγματοποιήθηκε από 3 ml της βακτηριακής καλλιέργειας χρησιμοποιώντας το NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kit της εταιρείας MACHEREY-NAGEL. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε προέρχεται από το εγχειρίδιο του NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kit και σκιαγραφείται στην εικόνα 2.

1 Cultivate and harvest bacterial cells			11,000 x g, 30 s		11,000 x g, 30 s
2 Cell lysis			250 µL Buffer A1 250 µL Buffer A2 RT, up to 5 min 300 µL Buffer A3		250 µL Buffer A1 250 µL Buffer A2 RT, up to 5 min 300 µL Buffer A3
3 Clarification of the lysate			11,000 x g, 5–10 min		11,000 x g, 5 min
4 Bind DNA			Load supernatant 11,000 x g, 1 min		Load supernatant 11,000 x g, 1 min
5 Wash silica membrane			(Optional: 500 µL Buffer AW: RT or 50 °C) 600 µL Buffer A4 11,000 x g, 1 min		450 µL Buffer AQ 11,000 x g, 3 min
6 Dry silica membrane			11,000 x g, 2 min	Drying is performed during centrifugation of the single washing step	
7 Elute DNA			50 µL Buffer AE RT, 1 min 11,000 x g, 1 min		50 µL Buffer AE RT, 1 min 11,000 x g, 1 min

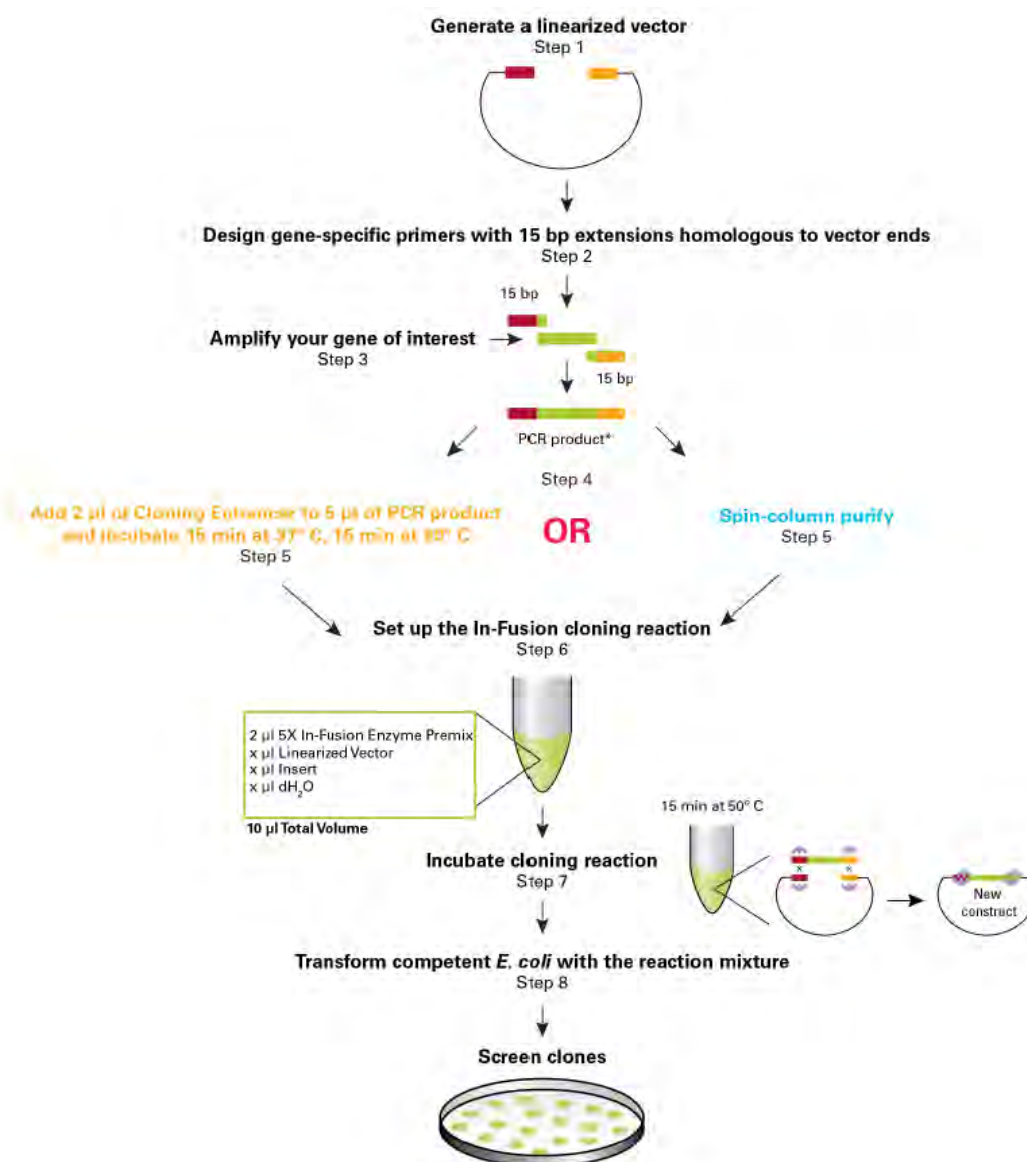
Εικόνα 2. Συγκεντρωτικό πρωτόκολλο καθαρισμού πλασμιδίου με το NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kit

Αλληλούχιση του DNA πλασμιδίου

Περίπου 1µg πλασμιδίου pET-33 b, που φέρει το μετάλλαγμα PARN E30A, στάλθηκε για αλληλούχιση DNA στο εργαστήριο CEMIA.

3.2. Κλωνοποίηση της PARN E30A

Για την κλωνοποίηση του μεταλλάγματος PARN E30A στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA4/TO, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του In-fusion HD cloning kit της εταιρείας Stratagene. Το πρωτόκολλο αυτό είναι σχεδιασμένο για γρήγορη και κατευθυνόμενη κλωνοποίηση ενός ή περισσότερων τμημάτων DNA σε έναν φορέα και σκιαγραφείται στην εικόνα 4. Η τεχνολογία που χρησιμοποιεί το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, βασίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό μεταξύ ενός τμήματος DNA και ενός γραμμικοποιημένου φορέα. Η αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού καταλύεται από το «In-fusion ένζυμο», μία ανασυνδυάση που αναγνωρίζει με ακρίβεια και εξειδίκευση κοινά άκρα των 15 bp που έχουν ο φορέας και το τμήμα DNA, το οποίο έχει ενισχυθεί με PCR με ειδικούς εκκινητές (για τον σχεδιασμό των ειδικών εκκινητών βλέπε παρακάτω).

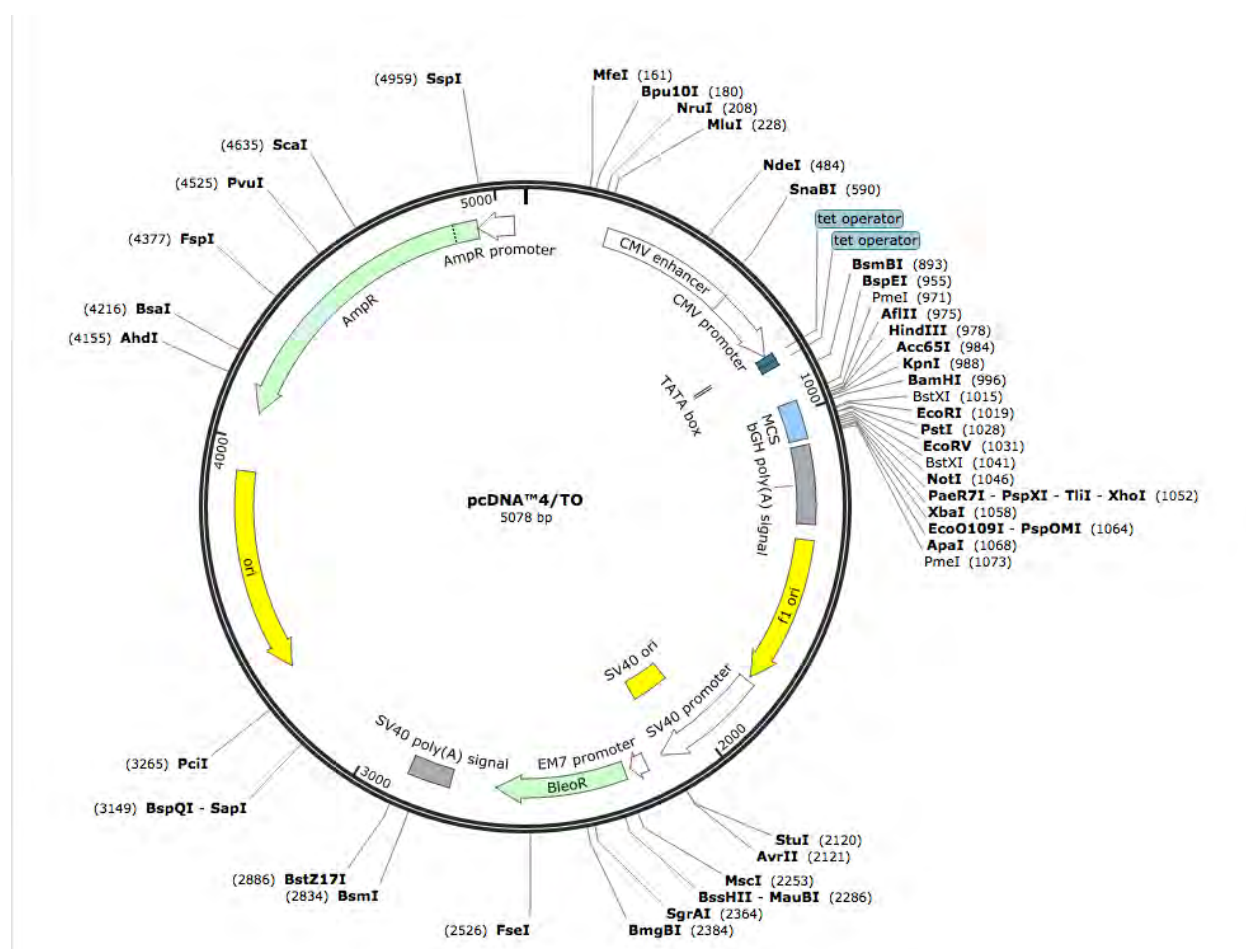


Εικόνα 4: Σχηματική παρουσίαση του πρωτοκόλλου κλωνοποίησης με το In-Fusion®HD Cloning Kit

Πρωτόκολλο κατασκευής του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου

Τα βήματα που ακολουθούμε για την κλωνοποίηση σύμφωνα με το πρωτόκολλο In-fusion HD cloning, είναι τα εξής (Εικόνα 1):

1^ο βήμα) Επιλογή του κατάλληλου φορέα κλωνοποίησης και προσδιορισμός της θέσης ένθεσης. Προκειμένου να υπερεκφραστεί επιλεγμένα το μετάλλαγμα PARN E30A, επιλέχθηκε ως φορέας κλωνοποίησης το πλασμίδιο pcDNA4/TO. Το πλασμίδιο αυτό φέρει έναν tet-χειριστή (tetO), ο οποίος βρίσκεται ανοδικά του προαγωγού (promoter) CMV και παρουσία τετρακυκλίνης ενεργοποιεί την μεταγραφή του ένθετου γονιδίου, που εισάγεται καθοδικά του προαγωγού, σε κύτταρα θηλαστικών. Έτσι, η αλληλουχίας του tet-χειριστή (tetO) επιτρέπει την υπερέκφραση του επιθυμητού γονιδίου. Ο χάρτης του εν λόγω πλασμιδίου φαίνεται στην εικόνα 3.



Εικόνα 3: Πλασμιδιακός φορέας pcDNA4/TO

2^ο βήμα) Γραμμικοποίηση του φορέα κλωνοποίησης pcDNA4/TO μετά από αντίδραση πέψης με το ένζυμο περιορισμού EcoRI. (10 U/μl) για 2 ώρες στους 37° C. Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται τα επιμέρους συστατικά της αντίδρασης πέψης με EcoRI. Μετά το πέρας των 2 ωρών το δείγμα τοποθετείται απευθείας στον πάγο για να σταματήσει η αντίδραση.

Πίνακας 5. Τα επιμέρους συστατικά της αντίδρασης πέψης με EcoRI

EcoRI	1 μl	37oC/ 2h
10X H Buffer	2 μl	
DNA πλασμιδίου pcDNA4/TO	10 μl	
ddH2O	7 μl	
Υτελ	20 1	

3^ο βήμα) Σχεδιασμός ειδικών PCR εκκινητών για την ενίσχυση του γονιδίου που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Ο σχεδιασμός γίνεται έτσι ώστε οι εκκινητές να παράγουν μία επιπλέον αλληλουχία των 15 bp στα άκρα του γονιδίου-στόχος, η οποία θα είναι ομόλογη με τα άκρα του γραμμικοποιημένου φορέα. Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρατίθενται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6. Εκκινητές ενίσχυση του μεταλλάγματος PARN E30A με αντίδραση PCR

PARNhdEcoRI Forward Primer	CAGTGTGGTGGGAATTCATGGAGATAATCAGGAACAA
PARNhdEcoRI Reverse Primer	GATATCTGCAGAATTCTTACCATGTGTCAGGAAGTTC

4^ο βήμα) Ενίσχυση του τμήματος DNA με PCR χρησιμοποιώντας μία DNA πολυμεράση υψηλής πιστότητας (high-fidelity DNA polymerase). Οι ποσότητες των επιμέρους αντιδραστηρίων και οι συνθήκες θερμικού προφίλ για την ενίσχυση του μεταλλάγματος PARN E30A παρουσιάζονται αναλυτικά στους παρακάτω πίνακες 7 και 8 αντίστοιχα.

Πίνακας 7. Ενίσχυση του μεταλλάγματος PARN E30A














25 μl of KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR (2X)
1 μl (~50 ng) of dsDNA template
1,5 μl (100 μM) of forward mutant primer
1,5 μl (100 μM) of reverse mutant primer
ddH2O to a final volume of 50 μl

Πίνακας 8. Θερμικό προφίλ ενίσχυσης του μεταλλάγματος PARN E30A

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	25 κύκλοι αντίδρασης	5° βήμα) Επαλήθευση
Αρχική αποδιάταξη	95	3 min		
Αποδιάταξη	98	20 sec		
Υβριδοποίηση	65	15 sec		
Επέκταση	72	2 min		
Τελική επέκταση	72	10 min		

ότι το DNA του μεταλλάγματος PARN E30A έχει ενισχυθεί ειδικά, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της αντίδρασης PCR σε gel αгарόζης 1%. Το ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση των νουκλεϊκών οξέων που χρησιμοποιήθηκε είναι το TAE 1X, με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 60 V και παρακολούθηση του μετώπου των χρωστικών που ενυπάρχουν στο loading buffer.

6° βήμα) Απομόνωση του προϊόντος PCR και του προϊόντος πέψης από την πηκτή αгарόζης (gel extraction), με βάση το πρωτόκολλο του NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit, της εταιρείας MACHEREY-NAGEL, το οποίο σκιαγραφείται στην εικόνα 5.

	PCR clean-up	Gel extraction	DNA clean-up (with SDS)	Single stranded DNA clean-up
1 <u>PCR clean-up, DNA clean-up, or single stranded DNA clean-up:</u> Adjust binding condition <u>Gel extraction:</u> Excise DNA fragment / solubilize gel slice	 200 µL NT1/ 100 µL PCR	  200 µL NT1/ 100 mg gel 50 °C 5–10 min	 500 µL NTB/ 100 µL sample	 200 µL NTC/ 100 µL sample
2 Bind DNA	  11,000 x g 30 s			
3 Wash silica membrane	  700 µL NT3 11,000 x g 30 s <u>Recommended:</u> 2 nd wash 700 µL NT3 11,000 x g 30 s			
4 Dry silica membrane	  11,000 x g 1 min			
5 Elute DNA	  15–30 µL NE RT 1 min 11,000 x g 1 min			

Εικόνα 5. Συγκεντρωτικό πρωτόκολλο εξαγωγής DNA από πηκτή αгарόζης με το NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit.

7° βήμα) Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ του προϊόντος PCR και του γραμμικού φορέα. Επώση της αντίδρασης για 30 min στους 50 °C, και επακόλουθη

τοποθέτηση στον πάγο. Τα επιμέρους συστατικά της αντίδρασης σύνδεσης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Μετά το πέρας των 30 min το δείγμα τοποθετείται απευθείας στον πάγο για να σταματήσει η αντίδραση.

Πίνακας 9. Τα επιμέρους συστατικά της αντίδρασης σύνδεσης

DNA πλασμιδίου pcDNA4/TO	1,25μl	50 °C/ 30 min
DNA ενθέματος PARN E30A	6,75μl	
Infusion HD Enzyme Premix (5X)	2μl	
Υπελ	10 μl	

8^ο βήμα) Μετασχηματισμός επιλεκτικών βακτηριακών κυττάρων XL 1-Blue (transformation) με την αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού.

9^ο βήμα) Επίστρωση τρυβλίων με τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα.

10^ο βήμα) Επιλογή των αποικιών που περιέχουν τον κλωνοποιημένο φορέα. Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση της PARN E30A είναι ο pcDNA4/TO, ο οποίος φέρει γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη για επιλογή σε καλλιέργειες στελεχών E. Coli.

Δημιουργία μικρών καλλιεργειών

Δημιουργία μικρών καλλιεργειών από αποικίες που περιέχουν τον κλωνοποιημένο φορέα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην Ενότητα 3.1.

Καθαρισμός πλασμιδίου

Καθαρισμός του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pcDNA4/TO, το οποίο φέρει το μεταλλάγμα PARN E30A από 3 ml της βακτηριακής καλλιέργειας με τη μέθοδο που περιγράφεται στην Ενότητα 3.1.

Πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου με το ένζυμο περιορισμού EcoRI

Για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του μεταλλάγματος PARN E30A στο πλασμίδιο pcDNA4/TO ακολούθησε πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pcDNA4/TO με το ένζυμο περιορισμού EcoRI, το οποίο αναγνωρίζει μία αλληλουχία $\overline{\text{GAATTC}}$ στην περιοχή πολυσυνδέτη του πλασμιδίου και άλλη μία αλληλουχία εσωτερικά της PARN E30A. Τα επιμέρους συστατικά και οι όγκοι της αντίδρασης πέψης, ορίστηκαν σύμφωνα με το αντίστοιχο πρωτόκολλο TAKARA για το EcoRI, και φαίνονται στον Πίνακα 10. Οι όγκοι ορίστηκαν ώστε το υπόστρωμα DNA να έχει ποσότητα $\leq 1\mu\text{g}$.

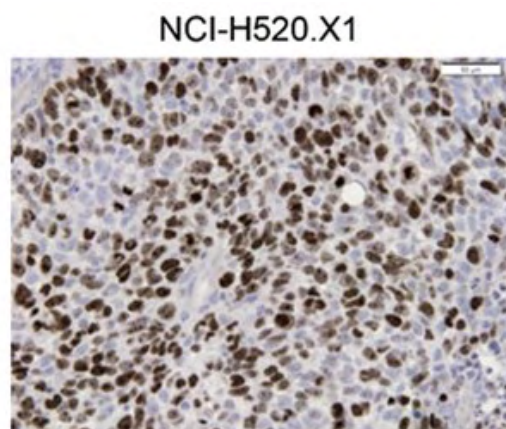
Πίνακας 10. Τα επιμέρους συστατικά της αντίδρασης πέψης με EcoRI

EcoRI (10 U/μl)	1 μl	37oC/ 2h
10X H Buffer	2 μl	
DNA πλασμιδίου	10 μl	
ddH ₂ O	7 μl	
Vτελ	20 μl	

3.3. Υπερέκφραση της PARN WT και PARN E30A σε κύτταρα θηλαστικών

Χειρισμός κυτταρικής σειράς

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά NCI-H520. Πρόκειται για ανθρώπινη κυτταρική σειρά από καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα. Τα κύτταρα της κυτταρικής αυτής σειράς σχηματίζουν μονόστιβες επιθηλιακές επιφάνειες στο ταπήτιο ανάπτυξης (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Κύτταρα NCI-H520

Απόψυξη κυττάρων

- 1) Τα φιαλίδια (cryovials) που περιέχουν τα κύτταρα από τους -80°C (ή υγρό άζωτο) όπου ήταν αποθηκευμένα, εμβαπτίζονται σε υδατόλουτρο (37°C) με ήπια ανάδευση.
- 2) Αφού ξεπαγώσουν τα κύτταρα, γίνεται καθαρισμός του φιαλιδίου με αιθανόλη (70%) εξωτερικά.
- 3) Ακολουθεί μεταφορά του αιωρήματος των κυττάρων σε φάλλον 15ml με επιπλέον προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υλικού μέχρι τα 10ml.
- 4) Φυγοκέντρωση του αιωρήματος στις 1500rpm για 2min.
- 5) Μεταφορά στον απαγωγό και απομάκρυνση του υπερκειμένου, προκειμένου να αποβάλουμε το DMSO που περιέχεται στο αρχικό κρυοπροστατευτικό θρεπτικό υλικό των κυττάρων και δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξή τους.

- 6) Προσθήκη 10 ml θρεπτικού RPMI (10% FBS) και μεταφορά σε T25 flask.
- 7) Επώση των κυττάρων στους 37°C μέχρι να προσκολληθούν στο ταπήτιο της φλάσκας.
- 8) Αφού η πληρότητα των κυττάρων φτάσει το 90-100%, μεταφέρουμε τα κύτταρα μετά από τρυψινοποίηση σε T75 flask.

Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων είναι απαραίτητη η διαδικασία της τρυψινοποίησης. Για να προβούμε σε τρυψινοποίηση, η πληρότητα των κυττάρων στο ταπήτιο της φλάσκας ανάπτυξης θα πρέπει να είναι 90-100%. Έτσι λοιπόν ακολουθούμε τα εξής βήματα:

- 1) Παρατηρούμε τα κύτταρα στο μικροσκόπιο. Ελέγχουμε και σημειώνουμε:
 - α. Μορφολογία κυττάρων και
 - β. Πληρότητα ταπητίου (confluency).
 - 2) Απομακρύνουμε (με αναρρόφηση) το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας.
 - 3) «Ξεπλένουμε» τα κύτταρα με διάλυμα PBS 1x (*).
 - 4) Προσθέτουμε διάλυμα τρυψίνης-EDTA 0.05% (0.5ml για φιάλη 75cm²).
 - 5) Ανακινούμε τη φιάλη έτσι ώστε το διάλυμα τρυψίνης να καλύψει όλο το ταπήτιο.
 - 6) Μεταφέρουμε τα κύτταρα στον επωαστήρα (κλίβανος 37°C) για περίπου 1-2min. Παρατηρούμε το σχήμα των κυττάρων στο μικροσκόπιο, και ελέγχουμε αν έχουν αποκτήσει σφαιρική μορφή.
 - 7) Προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού RPMI, 1% Antibiotic-antimycotic (10ml θρεπτικού για φιάλη 75cm²).
 - 8) Επαναεισφέρουμε τα κύτταρα και τα διασπείρουμε ομοιόμορφα με πιπέτα (των 10ml).
 - 9) Στο σημείο αυτό μπορούμε να χωρίσουμε τα κύτταρα σε δύο ή περισσότερες φλάσκες ή απλά να απομακρύνουμε μέρος των κυττάρων στην ήδη υπάρχουσα φλάσκα.
 - 10) Κάθε φορά που γίνεται η τρυψινοποίηση, καταγράφεται ως πέρασμα (π.χ. πέρασμα p25-passage 25).
- (*) Σημείωση: το PBS διάλυμα που χρησιμοποιείται στον χειρισμό των κυττάρων, είναι φιλτραρισμένο και αποστειρωμένο.

Συλλογή των κυττάρων

- 1)* Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων με παγωμένο και αποστειρωμένο PBS 1x (3 φορές).

- 2)* Τρυψινοποίηση των κυττάρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται παραπάνω.
- 3)* Ομογενοποίηση των αποκολλημένων κυττάρων με πιπετάρισμα σε PBS 1x (ή RPMI), και μεταφορά τους σε tubes 1,5ml.
- 4) Φυγοκέντρηση των κυττάρων για 5 min στις 3000rpm στους 4°C.
- 5) Απομάκρυνση του υπερκείμενου προσεκτικά και φύλαξη του ιζήματος στους -80 °C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν πειραματικά.

Ψύξη των κυττάρων

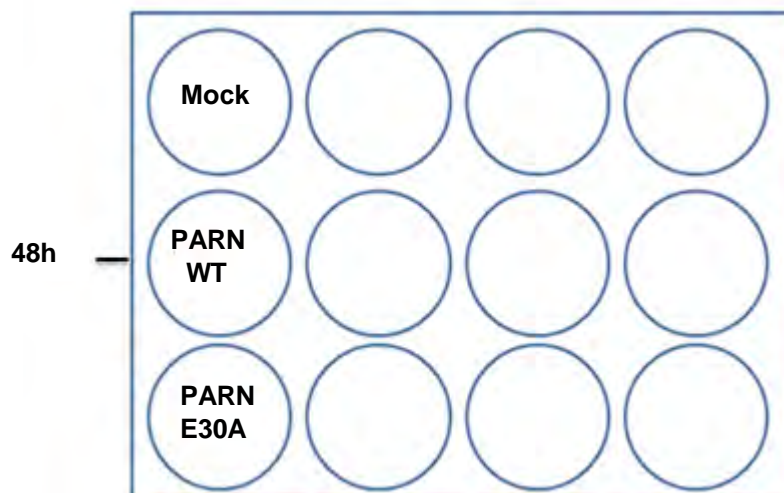
- 1) Τρυψινοποίηση κυττάρων.
- 2) Προσθήκη θρεπτικού υλικού (10ml για T75 flask).
- 3) Μεταφορά αιωρήματος σε φάλκον 15ml.
- 4) Φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 3min στους 6°C.
- 5) Μεταφορά στον απαγωγό και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- 6) Επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 1800μl RPMI (10%FBS).
- 7) Προσθήκη 200μl κρυοπροστατευτικού DMSO (τελικό κρυοπροστατευτικό διάλυμα 20% DMSO).
- 8) Μεταφορά σε cryovial.
- 9) Αργή ψύξη μέσα σε cryobox (1°C/1 min) στους -80°C.
- 10) Αποθήκευση στους -80°C ή σε υγρό άζωτο.

Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με χρήση λιποσωμάτων

Ως control της υπερέκφρασης της απαδενυλάσης PARN WT και του μεταλλάγματός της PARN E30A, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα NCI-H520 στα οποία εισήχθη πλασμίδιο pcDNA4/TO, που δεν φέρει κανένα διαγονίδιο – τα επονομαζόμενα Mock κύτταρα.

Πρωτόκολλο διαμόλυνσης:

- 1) Πρώτο βήμα αποτελεί η τρυψινοποίηση των κυττάρων μιας T75 flask στην οποία η πληρότητα των κυττάρων είναι 95%-100%. Ο αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται μετά από μέτρηση σε πλάκα Neubauer, και σε αυτή τη φλάσκα μπορούν να φτάσουν ως και $42,5 \times 10^5$ κύτταρα.
- 2) Σε κάθε well ενός 12-well plate προσθέτουμε το 1/12 από τα παραπάνω τρυψινοποιημένα κύτταρα έτσι ώστε σε κάθε well να έχουμε πληρότητα περίπου κατά 60%, μετά από επώαση στους 37°C, για 24h. Η πληρότητα των κυττάρων κατά 60% ενδείκνυται για τη διαμόλυνση (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. 12-well plate για υπερέκφραση των PARN WT και PARN E30A

- 3) Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε το X-fect reagent, το οποίο περιέχει το X-fect Polymer και το X-fect Reaction Buffer. Το X-fect Polymer σχηματίζει κατιονικά λιποσωμάτια και επιτρέπει τη διαμόλυνση πλασμιδιακού DNA στα κύτταρα των θηλαστικών με πολύ μεγάλη απόδοση. Το αντιδραστήριο αυτό συνδυαζόμενο με DNA, σχηματίζει λιποσώματα που συντήκονται με την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων-στόχων και αποχύνουν το περιεχόμενο DNA στο εσωτερικό του κυττάρου. Μεταβολές των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων DNA και X-fect Polymer είναι απαραίτητες για την βελτιστοποίηση της διαμόλυνσης. Επίσης, είναι αναγκαία στα πειράματα υπερέκφρασης και η ύπαρξη κυττάρων που χρησιμεύουν ως control και τα οποία διαμολύνονται με πλασμιδιακό φορέα ο οποίος δεν φέρει κανένα ένθεμα, κι έτσι δεν εκφράζει κανένα γονίδιο – τα επονομαζόμενα Mock κύτταρα. Έτσι, η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των PARN WT και PARN E30A καθώς και των miR 29a, pri-miR 29a, miR-1207 και των pri- miR-1207 των διαμολυσμένων κυττάρων, θα γίνει με τα Mock κύτταρα.
- 4) Για το σχηματισμό των λιποσωμάτων ετοιμάζουμε δύο διαλύματα: ένα DNA mix και ένα X-fect mix σύμφωνα με τις εξής ενδείξεις:
 - α. DNA mix: διαλύω 2,5μg πλασμιδίου (βλέπε πρωτόκολλο επαγωγής της έκφρασης της PARN WT και της PARN E30A σε κύτταρα θηλαστικών) σε X-fect Reaction Buffer, ώστε να έχω τελικό όγκο 50μl ανά well
 - β. X-fect mix: 0,75μl X-fect Polymer σε 50μl X-fect Reaction Buffer ανά well
- 5) Παρασκευή του transfection mix: Αναμιγνύουμε τα DNA mix και X-fect mix και τα αφήνουμε να επωαστούν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.

- 6) Παράλληλα απομακρύνουμε από κάθε well το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση και ξεπλένουμε τα κύτταρα με κρύο και αποστειρωμένο PBS 1x (0,5ml) δύο φορές. Πριν την προσθήκη του transfection mix προσθέτουμε θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά και χωρίς ορό (FBS) σε κάθε well (0,5ml RPMI/well).
- 7) Μετά το πέρας του χρόνου επώασης του transfection mix, μοιράζουμε το τελευταίο με κυκλικό τρόπο στα κύτταρα που προορίζονται για διαμόλυνση και αφήνουμε το 12-well plate να επωαστεί στους 37°C.
- 8) Μετά από 5-6h, απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό από τα διαμολυσμένα κύτταρα και το αντικαθιστούμε με 0,5ml φρέσκο RPMI (10% FBS, 1% Antibiotic-Antimycotic) και επωάζουμε τα κύτταρα ο/η στους 37°C.

Την επόμενη ημέρα συνεχίζουμε με το πρωτόκολλο επαγωγής της έκφρασης της PARN WT και της PARN E30A σε κύτταρα θηλαστικών, όπως αυτό περιγράφεται στη συνέχεια.

Επαγωγή από τετρακυκλίνη σύστημα γονιδιακής έκφρασης

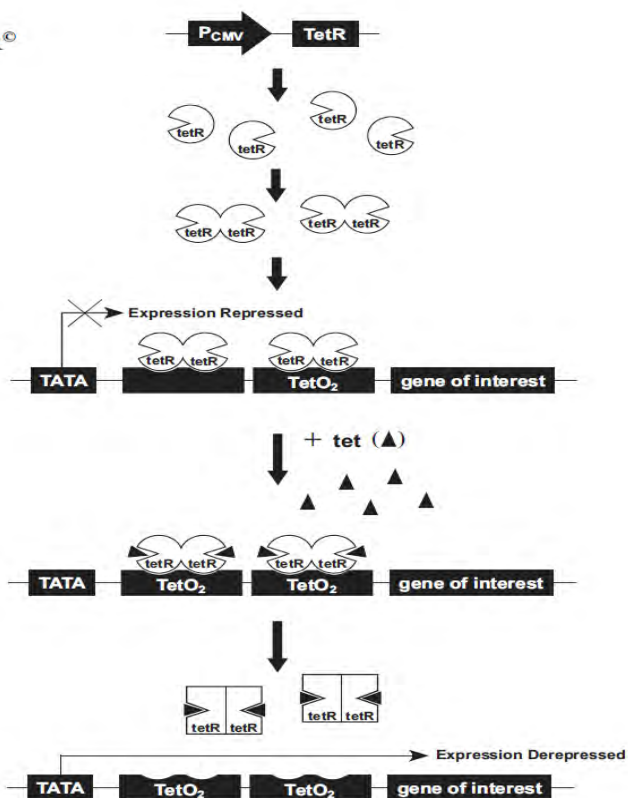
Προκειμένου να υπερεκφραστούν επιλεγμένα η PARN WT και η PARN E30A στα κύτταρα NCI-H520 βασιστήκαμε στο T-REx επαγωγίμο από τετρακυκλίνη σύστημα γονιδιακής έκφρασης σε κύτταρα θηλαστικών, της Life Technologies. Σχηματική απεικόνιση του συστήματος αυτού παρουσιάζεται στην εικόνα 8.

1. Tet repressor (tetR) protein is expressed from pcDNA6/TR[®] in cultured cells.

2. TetR homodimers bind to Tet operator 2 (TetO₂) sequences in the inducible expression vector, repressing transcription of the gene of interest.

3. Upon addition, tetracycline (tet) binds to tetR homodimers.

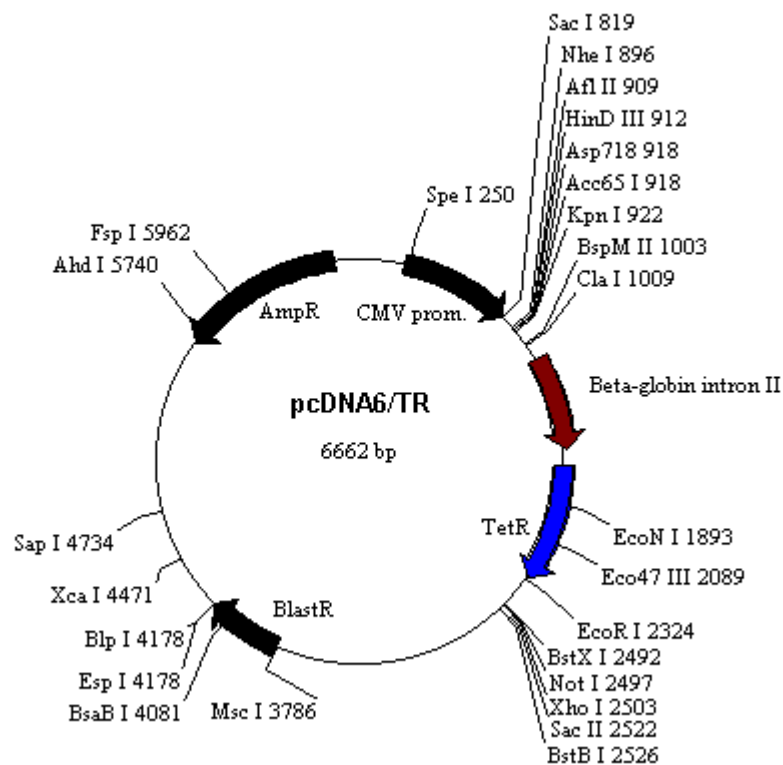
4. Binding of tet to tetR homodimers causes a conformational change in tetR, release from the Tet operator sequences, and induction of transcription from the gene of interest.



Εικόνα 8: Σχηματική παρουσίαση του T-REx επαγωγίμου από τετρακυκλίνη συστήματος γονιδιακής έκφρασης

Το σύστημα T-REx αποτελείται από 2 πλασμίδια:

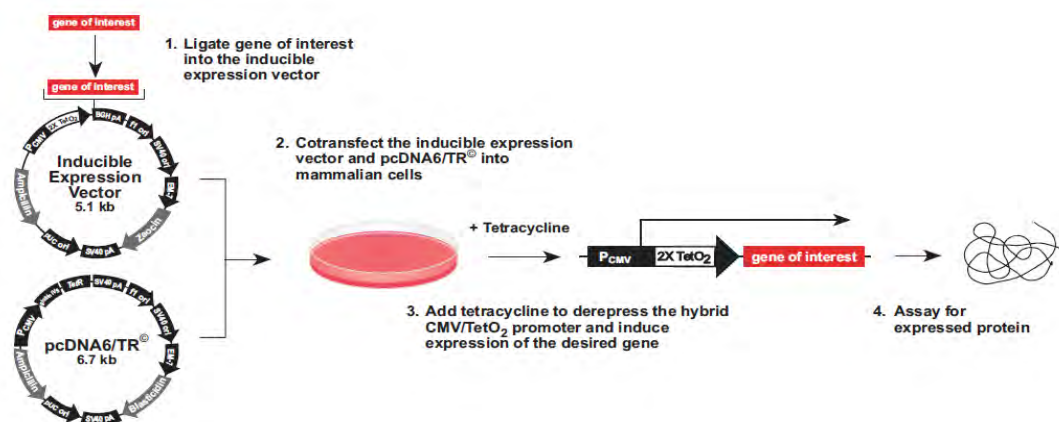
1. Το πλασμίδιο pcDNA6/TR, το οποίο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη tetR, η οποία αποτελεί καταστολέα της έκφρασης του διαγονιδίου που φέρει το πλασμίδιο pcDNA4/TO. Ο χάρτης του πλασμιδίου pcDNA6/TR φαίνεται στην εικόνα 9 παρακάτω.
2. Το πλασμίδιο pcDNA4/TO, το οποίο φέρει το επιθυμητό διαγονίδιο, καθοδικά του TetO χειριστή, στον οποίο, απουσία τετρακυκλίνης, συνδέεται ένα ομοδιμερές του καταστολέα tetR, αποσιωπώντας έτσι την έκφραση του διαγονιδίου. Αντίθετα, παρουσία τετρακυκλίνης, η τετρακυκλίνη συνδέεται με το ομοδιμερές του καταστολέα tetR, προκαλώντας του αλλαγή της διαμόρφωσής του, με αποτέλεσμα να αποδεσμεύεται ο καταστολέας από την θέση του TetO χειριστή και επάγωντας έτσι την έκφραση του διαγονιδίου. Ο χάρτης του πλασμιδίου pcDNA4/TO φαίνεται στην εικόνα 3 της ενότητας 3.2.



Εικόνα 9: Ο χάρτης του πλασμιδίου pcDNA6/TR.

Πρωτόκολλο επαγωγής της έκφρασης της PARN WT και της PARN E30A σε κύτταρα θηλαστικών

Στην παρούσα εργασία για την υπερέκφραση της PARN WT και της PARN E30A σε κύτταρα NCI-H520 βασιστήκαμε στο πρωτόκολλο του T-REx επαγωγίμου από τετρακυκλίνη συστήματος γονιδιακής έκφρασης, της Life Technologies, όπως αυτό παρουσιάζεται στην εικόνα 10 παρακάτω.



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου επαγωγής της έκφρασης της PARN WT και της PARN E30A σε κύτταρα θηλαστικών

Συγκεκριμένα, για την υπερέκφραση της PARN WT, τα κύτταρα NCI-H520, διαμολύνθηκαν, σύμφωνα με το πρωτόκολλο διαμόλυνσης κυττάρων της ενότητας 3.3., ταυτόχρονα με το πλασμίδιο pcDNA4/TO, το οποίο φέρει το cDNA της PARN WT, και με το πλασμίδιο pcDNA6/TR σε αναλογία 1:6 (w/w). Σε αντιστοιχία, για την υπερέκφραση του μεταλλάγματος PARN E30A, τα κύτταρα NCI-H520, διαμολύνθηκαν, σύμφωνα με το πρωτόκολλο διαμόλυνσης κυττάρων της ενότητας 3.3., ταυτόχρονα με το πλασμίδιο pcDNA4/TO, το οποίο φέρει το cDNA του μεταλλάγματος PARN E30A, και με το πλασμίδιο pcDNA6/TR σε αναλογία 1:6 (w/w). Επιπλέον, τα κύτταρα Mock, που χρησιμοποιήθηκαν ως control, διαμολύνθηκαν ταυτόχρονα με το πλασμίδιο pcDNA4/TO, το οποίο δε φέρει κανένα διαγονίδιο, και με το πλασμίδιο pcDNA6/TR σε αναλογία 1:6 (w/w).

Προέκυψαν έτσι, 3 διαφορετικά δείγματα κυττάρων:

1. Mock: Κύτταρα NCI-H520 διαμολυσμένα ταυτόχρονα με το πλασμίδιο pcDNA4/TO, το οποίο δε φέρει κανένα διαγονίδιο, και με το πλασμίδιο pcDNA6/TR.
2. PARN WT: Κύτταρα NCI-H520 διαμολυσμένα ταυτόχρονα με το πλασμίδιο pcDNA4/TO, το οποίο φέρει το cDNA της PARN WT, και με το πλασμίδιο pcDNA6/TR
3. PARN E30A: Κύτταρα NCI-H520 διαμολυσμένα ταυτόχρονα με το πλασμίδιο pcDNA4/TO, το οποίο φέρει το cDNA της PARN E30A, και με το πλασμίδιο pcDNA6/TR

Στην παρούσα εργασία τα βήματα που ακολουθήθηκαν μετά την διαμόλυνση των κυττάρων είναι τα εξής παρακάτω:

- 1) Προετοιμασία αντιβιοτικού Dox, το οποίο αποτελεί παράγωγο της τετρακυκλίνης, προσθέτοντας 3μl αντιβιοτικού Dox (0,5μg/ml) σε 5,4μl θρεπτικού RPMI (10% FBS).
- 2) Απομάκρυνση από κάθε well του θρεπτικού υλικού με αναρρόφηση και πλύση των κυττάρων με κρύο και αποστειρωμένο PBS 1x (0,5ml) δύο φορές.
- 3) Προσθήκη αντιβιοτικού Dox.
- 4) Επώαση των κυττάρων για 48h στους 37°C παρουσία του αντιβιοτικού Dox.
- 5) Συλλογή των κυττάρων (για συλλογή κυττάρων βλ. Ενότητα 3.1)

3.4. Απομόνωση ολικού RNA και πρωτεϊνών από κύτταρα θηλαστικών

Για την απομόνωση του RNA και των πρωτεϊνών από τα κύτταρα NCI-H520, όπου έγινε η υπερέκφραση της απαδενυλάσης PARN WT και του μεταλλάγματός της PARN E30A, έγινε χρήση του TRIzol reagent kit, ενώ για την ανάκτηση του ολικού RNA από τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το miNucleoSpin® miRNA kit.

Πρωτόκολλο TRIzol reagent kit:

Βήμα 1^ο) Μετά τη συλλογή των κυττάρων μετά από την υπερέκφραση (όπως πειργράφεται στην Ενότητα 3.3.), ακολουθεί λύση των κυττάρων με την προσθήκη στο ίζημα των κυττάρων ενός όγκου TRI reagent (1V). Ανάλογα με την ποσότητα των κυττάρων που έχουν καθιζάνει, ορίζεται και ο όγκος. Για το 12-well plate που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση στο παρόν πείραμα, ένας όγκος του 0,5ml είναι αρκετός. Ακολουθεί διάλυση των κυττάρων με πιπετάρισμα. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5min.

Βήμα 2^ο) Ακολουθώς προσθέτουμε 50μl 1-bromo-3-chloropropane (0,1V), ανακινούμε και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 15min. μετά το πέρας της επώασης φυγοκεντρούμε στα 12000g για 15min στους 4 °C. Με τον τρόπο αυτό γίνεται διαχωρισμός των φάσεων, κατά τον οποίο το ολικό RNA μεταπίπτει στην υδατική φάση, ενώ οι πρωτεΐνες στην οργανική.

Βήμα 3^ο) Συλλογή και μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο tube, όπου και γίνεται προσθήκη 0,25ml 2-propanol (0,5V), προκειμένου να γίνει καθίζηση του RNA. Ανακινούμε και επωάζουμε για 10min. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 12000g για 10min στους 4 °C.

Βήμα 4^ο) Γίνεται αφαίρεση του υπερκειμένου. Ακολουθεί καθαρισμός από προσμίξεις με προσθήκη 1ml αιθανόλης 75% (2V) στο ίζημα του RNA. Ανακινούμε και επωάζουμε για 20min στους -20 °C. Τέλος, φυγοκεντρούμε στα 12000g για 5min στους 4 °C.

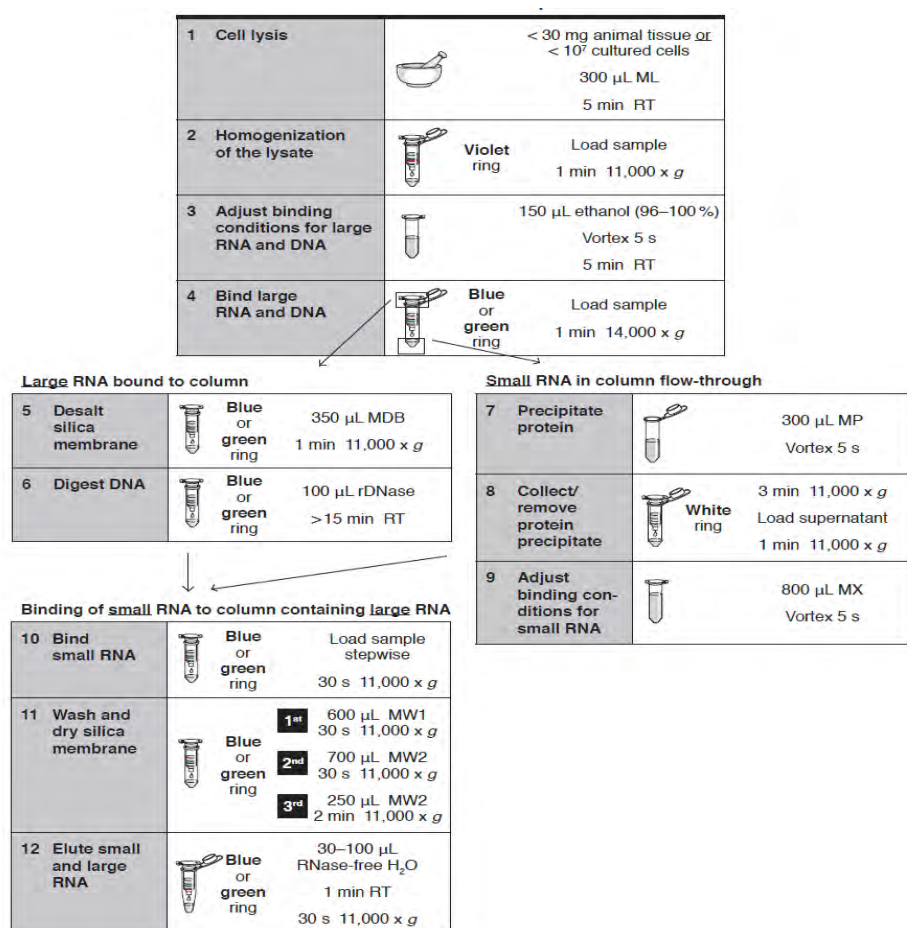
Βήμα 5^ο) Αφαιρούμε το υπερκείμενο προσεκτικά μέσα σε hood και αφήνουμε το ίζημα να αφυδατωθεί, προκειμένου να μην παραμείνει καθόλου αιθανόλη.

Βήμα 6^ο) Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε ddH₂O με διαρκές πιπετάρισμα και επώαση για 5min στους 55°C.

Βήμα 7^ο) Τέλος, φυλάσσουμε το RNA στους -80 °C.

Πρωτόκολλο miNucleoSpin® miRNA kit:

Προκειμένου να μελετήσουμε τα επίπεδα των miRNAs, μετά από υπερέκφραση της PARN WT και PARN E30A, χρησιμοποιήθηκε το miNucleoSpin® miRNA kit, για την βελτιστοποίηση της απόδοσης και τη μείωση των δυνητικά ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων που μπορεί να προέκυπτan με τη χρήση του TRIzol reagent kit, λόγω του μικρού μεγέθους των μορίων miRNAs. Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της απομόνωσης RNA από κυτταροκαλλιέργεια για την ανάκτηση του ολικού RNA, όπου το RNA μεγάλης (mRNAs, tRNAs, rRNAs, snRNAs) και μικρής κλίμακας (miRNAs,) συλλέχθηκε σε ένα συγκεντρωτικό κλάσμα. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε αποτελούνταν από υποβολή του δείγματος σε στήλη και διαδοχικές φυγοκεντρήσεις (11.000g), προκειμένου για την ανάκτηση του RNA, μετά από έκλουσή του στο τελικό διάλυμα. Το συγκεντρωτικό πρωτόκολλο απομόνωσης σκιαγραφείται στην εικόνα 11.



Εικόνα 11. Συγκεντρωτικό πρωτόκολλο απομόνωσης RNA και πρωτεϊνών με το miNucleoSpin® miRNA kit

Με το παραπάνω πρωτόκολλο ήταν δυνατή επίσης και η ανάκτηση του πρωτεϊνικού κλάσματος (βήμα 8), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην ανοσοαποτύπωση για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών (βλ. Ενότητα 3.6.).

3.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε δύο βήματα (Two step Real Time PCR)

Η Real Time PCR είναι μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους προσδιορισμού γονιδιακής έκφρασης. Είναι μία ιδιαίτερα ευαίσθητη και εξειδικευμένη τεχνική καθώς μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και ένα αντίγραφο ενός μεταγράφου ή ακόμα να ανιχνεύσει διαφορετικής έντασης έκφραση μεταξύ δύο δειγμάτων σε ποσοστό έως και 23%. Μπορεί να διεξαχθεί σε ένα βήμα (one step reaction), όπου η όλη διαδικασία από τη σύνθεση του cDNA μέχρι την αντίδραση πολυμεράσης συμβαίνει στο ίδιο tube ή σε δύο βήματα (two-steps) όπου η αντίστροφη μεταγραφή και η ενίσχυση του παραγόμενου cDNA πραγματοποιούνται σε διαφορετικά tubes. Η one step Real time PCR θεωρείται ότι μειώνει την πειραματική απόκλιση γιατί οι ενζυμικές αντιδράσεις συμβαίνουν στο ίδιο tube. Ωστόσο αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί μία αρχική RNA μήτρα η οποία είναι επιρρεπής σε αποικοδόμηση.

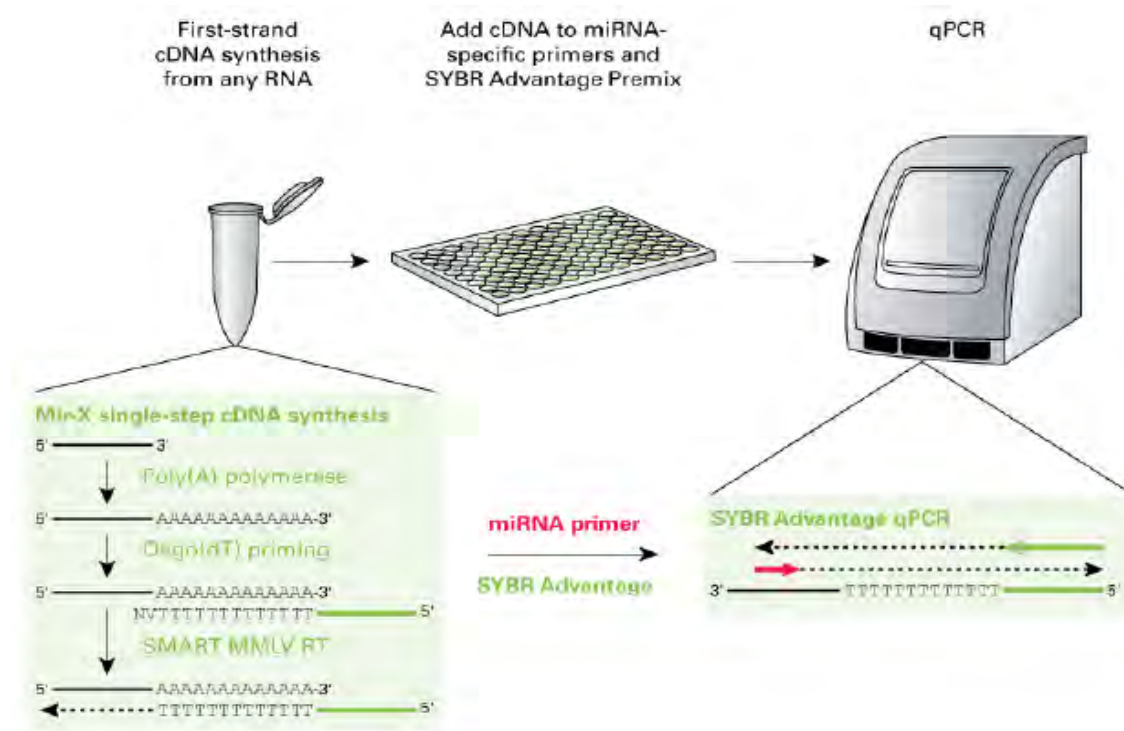
Η Real Time PCR επιτρέπει τη μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός μορίου-στόχου σε όλη τη διάρκεια της PCR. Ύστερα από μια αρχική φάση κατά την οποία δεν είναι ανιχνεύσιμο το προϊόν της PCR λόγω του ότι βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα, ακολουθεί μία εκθετική φάση κατά την οποία η ποσότητα του προϊόντος σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Αν υπάρχουν περισσότερα μόρια-στόχοι αρχικά στο tube, θα χρειαστούν λιγότεροι κύκλοι για να ξεκινήσει η εκθετική φάση. Συγκρίνοντας τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την έλευση της εκθετικής φάσης σε διαφορετικές αντιδράσεις, μπορούμε να προσδιορίσουμε την αρχική ποσότητα των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα στις αντιδράσεις.

Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό του προϊόντος της PCR που υπάρχει στο τέλος κάθε κύκλου, αλλά όλες βασίζονται στην ανίχνευση μιας φθορίζουσας ετικέτας (tag), η οποία συνδέεται σε κάθε μόριο που συντίθεται. Οι πρώτες ετικέτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το βρωμιούχο αιθίδιο και το SYBR Green I. Και τα δύο εισχωρούν στις αλυσίδες του δίκλωνου DNA.

Στην παρούσα εργασία εφαρμόσαμε την ποσοτική two-step RT-PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Clontech Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis and SYBR® qRT-PCR.

Το πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να γίνει σύνθεση cDNA στο πρώτο βήμα, με μήτρα RNA μόρια, συμπεριλαμβανομένου των miRNAs, ενώ στο δεύτερο βήμα έγινε η ποσοτικοποίηση των μορίων με ενίσχυση qRT-PCR.

Το Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit χρησιμοποιείται για τη μετατροπή των μορίων mRNA σε cDNA, και των εξειδικευμένων μορίων miRNAs, τα οποία δεν φέρουν πολύ-(A) ουρά, σε αντίθεση με τα mRNAs, και η ποσοτικοποίηση με RT-PCR θα ήταν αδύνατη σε ένα μόνο βήμα. Έτσι λοιπόν, σε μία μονή αντίδραση όλα τα μόρια RNA πολυαδενυλιώνονται με την πολύ-(A) πολυμεράση, και ακολουθεί αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA, με τη βοήθεια αντίστροφης μεταγραφάσης, η οποία χρησιμοποιεί ως εκκινητή τον oligo-dT primer που έχει συμπληρωματικότητα με την πολυ(A) ουρά (Εικόνα 12). Προκύπτουν έτσι μόρια cDNA από τα miRNAs αλλά και από τα mRNA του δείγματος, τα οποία μπορεί να αποτελούν στόχους των miRNAs. Με αυτό τον τρόπο, μπορούμε να εξετάσουμε τις αλλαγές στα επίπεδά τους λόγω δυνητικών αλληλεπιδράσεων σε ένα δείγμα, με qRT-PCR (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Βήματα που ακολουθούνται στην two-step RT-PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Clontech Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis

Σύνθεση cDNA

Το πρωτόκολλο για τη σύνθεση cDNA ακολουθεί την παρακάτω διαδικασία:

1) Σε ένα tube 0.2 ml, ελεύθερο ριβονουκλεασών (RNase-free), γίνεται συνδυασμός των εξής αντιδραστηρίων:

Πίνακας 11: Αντίδραση σύνθεσης cDNA

Reagent	Volume (μl)
mRQ Buffer (2X)	5
RNA sample (0.25–8 μg)	3.75
mRQ Enzyme	1.25
Total volume	10

2) Επωάζουμε σε θερμοκυκλοποιητή για 1h στους 37 °C, και τερματίζουμε για 5min στους 85 °C, για την αδρανοποίηση των ενζύμων.

3) Αραιώνουμε το νεοσυντιθέμενο δείγμα cDNA προσθέτοντας 90μl ddH₂O, φέρνοντας τον τελικό όγκο στα 100μl.

4) Το δείγμα cDNA που προκύπτει είναι έτοιμο προς χρήση στην qRT-PCR. Αποθηκεύουμε το δείγμα cDNA στους –20°C, έως ότου γίνει προετοιμασία της PCR, ή αν επιθυμούμε η τελευταία να γίνει άλλη χρονική στιγμή.

qRT-PCR

Για την ποσοτικοποίηση των miRNAs αλλά και των mRNAs των PARN WT και PARN E30A, εφαρμόστηκε συγκριτική ποσοτική Real Time PCR (Comparative qRT-PCR) με τη μέθοδο ΔΔCt, με την οποία η κανονικοποίηση γίνεται με τη βοήθεια ιδιοσυστατικών γονιδίων αναφοράς. Με την εν λόγω μέθοδο, τα επίπεδα των miRNAs καθορίστηκαν συγκριτικά με τα επίπεδα του γονιδίου αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε - σε αυτή την περίπτωση του U6 - ενώ τα επίπεδα των mRNAs των PARN WT και PARN E30A καθορίστηκαν συγκριτικά με τα επίπεδα της β-ακτίνης.

Μέθοδος $\Delta\Delta Ct$

Ο προσδιορισμός των επιπέδων των miRNAs (ή των mRNAs) μεταξύ δύο δειγμάτων (π.χ. mock και εξεταζόμενο δείγμα) γίνεται βάσει της παρακάτω εξίσωσης:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Ct \text{ target (control-treated)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct \text{ ref (control-treated)}}}$$

Όπου:

E_{target}: ο βαθμός ενίσχυσης του miRNA (ή του mRNA),

E_{ref}: ο βαθμός ενίσχυσης του γονιδίου αναφοράς (U6 ή β-ακτίνης),

Ct: ο κύκλος αντίδρασης κατά τον οποίο επιτυγχάνεται η ουδός φθορισμού της χρωστικής παρακολούθησης της ενίσχυσης (SYBR Green dye),

ΔCt target: η διαφορά Ct control – Ct treated του miRNA (ή του mRNA) στο control και στο εξεταζόμενο δείγμα αντίστοιχα,

ΔCt reference: η διαφορά Ct control – Ct treated του U6 (ή β-ακτίνης) στο control και στο εξεταζόμενο δείγμα.

Ο βαθμός ενίσχυσης E, θεωρητικά προσεγγίζει την τιμή 2, κάτι που σημαίνει ότι σε κάθε κύκλο αντίδρασης της PCR, ο στόχος διπλασιάζεται.

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων των παραμέτρων που εξετάσαμε στο ίδιο δείγμα – των επιλεγμένων miRNAs: miR 29a, pri- miR 29a, miR-1207, pri- miR-1207, και των mRNAs των PARN WT και PARN E30A, μετά από υπερέκφραση των τελευταίων – έγινε σε ξεχωριστές αντιδράσεις PCR, όπου οι συνθήκες θερμικού προφίλ και οι ποσότητες των επιμέρους αντιδραστηρίων ήταν διαφοροποιημένες. Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται αναλυτικά στους παρακάτω πίνακες 12,13,14 και 15.

Πίνακας 12. Ενίσχυση miRNAs και U6

Reagent	Volume (μl)
K-SYBR mix	10.0
miRNA-specific 5' primer (10μM)	0.2
mRQ 3' primer (10μM)	0.2
ROX dye low	0.4
ddH ₂ O	8.2
cDNA	1.0
Total volume	20.0

Πίνακας 13. Ενίσχυση mRNA των PARN WT, PARN E30A , pri- miR 29a, pri- miR-1207 και β-ακτίνης

Reagent	Volume (μl)
K-SYBR mix	10.0
Forward primer (10μM)	0.1
Reverse primer (10μM)	0.1
ROX dye low	0.4
ddH ₂ O	7.4
cDNA	2.0
Total volume	20.0

Όπου:

K-SYBR mix: αποτελεί μείγμα DNA πολυμεράσης, dNTPs, ιόντων Mg²⁺, και χρωστικής παρακολούθησης SYBR Green,

miRNA-specific 5' primer: είναι ο 5' εκκινητής, ειδικός για το miRNA,

mRQ 3' primer: αποτελεί τον 3'-oligo-dT εκκινητή, ο οποίος είναι συμπληρωματικός με την πολυ(A) ουρά των miRNAs,

ROX dye: η χρωστική αναφοράς, η οποία μειώνει το θόρυβο του μηχανήματος (θερμοκυκλοποιητή).

Πίνακας 14. Θερμικό προφίλ ενίσχυσης miRNAs και U6

Type of reaction	Cycling conditions
Denaturation (1 cycle)	95 °C, 10sec
Amplification (x40 cycles)	95 °C, 5sec
	60 °C, 20sec
Dissociation	95 °C, 60sec
	55 °C, 30sec
	95 °C, 30sec

Πίνακας 15. Θερμικό προφίλ ενίσχυσης mRNAs των PARN WT, PARN E30A, pri- miR 29a, pri- miR-1207 και β-ακτίνης

Type of reaction	Cycling conditions
Denaturation (1 cycle)	95°C, 3 min
Amplification (x40 cycles)	95 °C, 3 sec
	60 °C, 30 sec
	72 °C, 11sec
Dissociation (1 cycle)	95 °C, 60sec
	55 °C, 30sec
	95 °C, 30sec

Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν τα σφάλματα, οι αντιδράσεις για την ποσοτικοποίηση των miRNAs πραγματοποιήθηκαν σε duplicates, ενώ των mRNAs, σε triplicates. Για κάθε διαφορετικό ζεύγος εκκινητών, στην αντίδραση συμπεριλήφθηκε ως αρνητικό control, NTC αντίδραση που στερούνταν δείγματος cDNA (No Template Control).

Οι ειδικοί για τα miRNAs εκκινητές σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια της ανάκτησης της αλληλουχίας των δύο miRNAs, από τη βάση δεδομένων miRBase, ενώ οι εκκινητές των PARN WT και PARN E30A και των γονιδίων αναφοράς, σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος PRIMER 3. Ο κάθε εκκινητής ελέγχθηκε ως προς την εξειδίκευση του για το αντίστοιχο cDNA-στόχο με Blastn. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον πίνακα 16.

Πίνακας 16. Εκκινητές των παραγόντων που μελετήθηκαν

PARN WT/ PARN E30A	FORWARD	GCACAACCGATTTTTCCTACT
	REVERSE	CTCTTGTGAGGCCTTTCCTG
b-actin	FORWARD	GGACTTCGAGCAAGAGATGG
	REVERSE	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
U6	FORWARD	GGAATGACACAGTGAAGATTGG
	REVERSE	TTTCCTGTCATCCTTGCACA
miR-29a	5'-specific primer	TAGCACCATCTGAAATCGGTTA
pri-miR-29a	FORWARD	CCAACCCTCACGACCTTCTG
	REVERSE	TCCTCTAGCAGTCAGCATCA
miR-1207	5'-specific primer	TGGCAGGGAGGCTGGGAGG
pri- miR-1207	FORWARD	GGAGCCCTTCTTTTTTCCTG
	REVERSE	CAAGACGCAAACATCTCGAA

Η ανάλυση των δεδομένων μετά την ενίσχυση των δειγμάτων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος MxPro.

3.6. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blotting)

SDS-PAGE

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών των υπό ανάλυση δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου δύο φάσεων (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Η μία φάση του πηκτώματος αποτελεί το Stacking gel (5%), στην οποία έγινε φόρτωση των δειγμάτων των πρωτεϊνών και το «πακετάρισμά» τους στο ίδιο ύψος προκειμένου όλες οι διαδρομές να τρέξουν σύγχρονα. Τη δεύτερη φάση αποτελεί το πήκτωμα διαχωρισμού ή separating gel (10%), όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, υπό την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Η παρασκευή του διαφασικού πηκτώματος έγινε σύμφωνα με τα συστατικά των παρακάτω πινάκων 17 και 18 (Lab Faqs-Roche):

Πίνακας 17. Stacking gel 5%

Components	ml
H ₂ O	2,1
30% acryl-bisacrylamide mix	0,5
1,5M Tris (pH 6.8)	0,38
10% SDS	0,03
10% APS (ammonium persulfate)	0,03
TEMED	0,003
Vtot	3ml

Πίνακας 18. Separating gel 10%

Components	ml
H ₂ O	4
30% acryl-bisacrylamide mix	3.3
1,5M Tris (pH 8.8)	2.5
10% SDS	0.1
10% APS (ammonium persulfate)	0.1
TEMED	0.004
Vtot	10ml

Προσθέτουμε τελευταίους τους καταλύτες APS και TEMED για την πήξη των πηκτωμάτων.

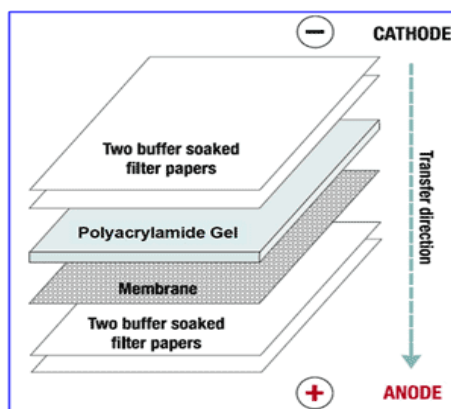
Το ίζημα πρωτεϊνών που λήφθηκε μετά από απομόνωση των πρωτεϊνών με το miNucleoSpin® miRNA kit, διαλυτοποιήθηκε σε SDS 1% υπό θέρμανση του διαλύματος στους 55 °C για 5min και ακολούθησε προσθήκη loading buffer 4x, προκειμένου να έχουμε συγκέντρωση 1x στο τελικό πρωτεϊνικό διάλυμα. Προκειμένου να γίνει αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών και διαχωρισμό των πρωτεϊνών, χωρίς διάσπαση του

πεπτιδικού δεσμού, ακολουθεί βρασμός των δειγμάτων στους 95 °C για 5min. Μετά από πλήρη διαλυτοποίηση των δειγμάτων, έγινε εμβάπτιση του πηκτώματος σε running buffer 1x μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και φόρτωση των δειγμάτων στο πηκτώμα. Οι ποσότητες των δειγμάτων που φορτώθηκαν, υπολογίστηκαν βάσει της καμπύλης Bradford που κατασκευάστηκε. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στα 120V, ενώ ο χρόνος εφαρμογής προσδιορίστηκε με βάση την παρακολούθηση του μετώπου της διαδρομής της χρωστικής που ενυπάρχει στο loading buffer (bromophenol blue).

Ανοσοαποτύπωση-Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών και διαχωρισμό τους ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, ακολουθεί ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη PVDF, είναι γνωστή ως Western blotting. Η ηλεκτρομεταφορά βασίζεται στο γεγονός ότι τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-SDS που είναι αρνητικά φορτισμένα, μετακινούνται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου προς την άνοδο, εξέρχονται από την πηκτή και καθιλώνονται στη μεμβράνη λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η μεμβράνη και η πηκτή μεταφέρονται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer). Στην περίπτωση της PVDF μεμβράνης προηγείται ένα στάδιο ενεργοποίησής της με εμβάπτιση της μεμβράνης σε μεθανόλη 100% πριν βυθιστεί στο διάλυμα μεταφοράς.

Η τοποθέτηση του gel και της μεμβράνης στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς (χρησιμοποιήθηκε Semidry Transfer System για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας) γίνεται ανάμεσα σε δύο ζεύγη από χαρτιά Whatman, με τη μεμβράνη προσανατολισμένη στο θετικό πόλο και την πηκτή στον αρνητικό (Εικόνα 13). Η επαφή μεταξύ της πηκτής και της μεμβράνης πρέπει να είναι άμεση χωρίς την παρεμβολή φυσαλίδων που παρεμποδίζουν τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η μεταφορά των πρωτεϊνών στην συγκεκριμένη εργασία έγινε κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος στα 270 mA, για 40 min, χρόνος που μπορεί όμως να διαφέρει ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που πρόκειται να μεταφερθούν. Μπορούν να παρακολουθηθούν οι μάρτυρες που θα μεταφερθούν από την πηκτή στη μεμβράνη και να εκτιμηθεί ο κατάλληλος χρόνος για την κάθε περίπτωση. Παράλληλα μπορεί να τοποθετηθεί και δεύτερη μεμβράνη κάτω από την πρώτη, ώστε να μεταφερθούν εκεί οι πρωτεΐνες αν εφαρμοστεί μεγαλύτερος χρόνος ή μεγαλύτερη ένταση ρεύματος. Η επιβεβαίωση της μεταφοράς έγινε με ανοσοανίχνευση.



Εικόνα 13. Συναρμολόγηση συσκευής ηλεκτρομεταφοράς

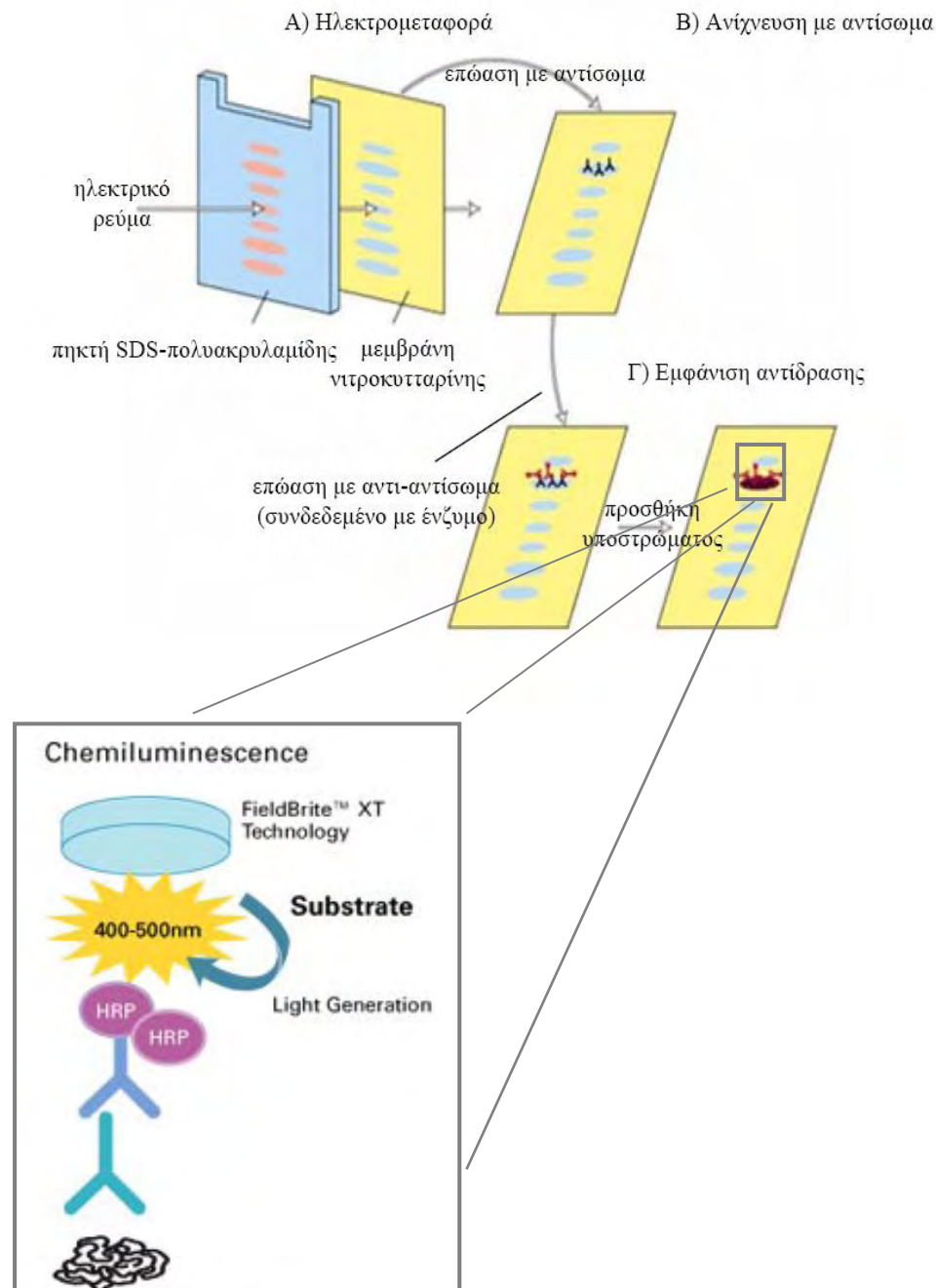
Ανοσοανίχνευση

Αφού μεταφερθούν οι πρωτεΐνες στη μεμβράνη PVDF, γίνεται οπτικοποίησή τους με ανοσοανίχνευση. Η ανοσοανίχνευση είναι μια τεχνική που επιτρέπει τον εντοπισμό μιας καθηλωμένης στη μεμβράνη πρωτεΐνης με τη βοήθεια αντισώματος. Η τεχνική βασίζεται στο γεγονός ότι όταν η καθηλωμένη πρωτεΐνη-«αντιγόνο» αλληλεπιδράσει με το αντίσωμα, μπορεί να ανιχνευτεί με τη βοήθεια ενός δεύτερου αντισώματος, ειδικού για το πρώτο.

Αρχικά η μεμβράνη PVDF μετά την ηλεκτρομεταφορά εμβαπτίζεται υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα σε blocking buffer ώστε να κορεστεί η μεμβράνη από την καζεΐνη του γάλακτος, η οποία δεσμεύει τις μη ειδικές θέσεις πάνω στη μεμβράνη. Με αυτό τον τρόπο αποφεύγονται οι μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα που είναι ειδικό για την επιθυμητή πρωτεΐνη. Κατόπιν η μεμβράνη επώάζεται με το πρώτο αντίσωμα (στην προκειμένη περίπτωση ως πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε ορός μετά από ανοσοποίηση κουνελιού με PARN (PARN (H-105) - Rabbit polyclonal antibody IgG) σε αραιώση 1:500 σε blocking buffer) υπό συνεχή ανάδευση overnight στους 4°C. Ακολουθούν 6 πλύσεις της μεμβράνης με PBS-T (Washing buffer) έκαστης 15min υπό ανάδευση, και στη συνέχεια επώαση της μεμβράνης για 1 ώρα παρουσία του δευτέρου αντισώματος (φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένη υποξείδωση), υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ως δεύτερο αντίσωμα στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε goat anti-rabbit IgG-HRP αραιωμένο 1:10.000. Της διαδικασίας εμφάνισης του σήματος προηγούνται τρεις πλύσεις της μεμβράνης με PBS-T των 15min.

Η ανίχνευση του ειδικού σήματος στη συνέχεια οφείλεται στο φαινόμενο της χημειοφωταύγειας, καθώς το δεύτερο αντίσωμα που είναι ειδικό έναντι rabbit IgG ανοσοσφαιρινών, μετά την προσθήκη κατάλληλου αντιδραστηρίου δίνει προϊόν που

παράγει έντονο φως (συγκεκριμένα ως αποτέλεσμα οξείδωσης της λουμινόλης από την υπεροξειδάση), το οποίο αποτυπώθηκε σε φωτογραφικό φιλμ με τη μορφή σκοτεινής ζώνης (Εικόνα 14). Η εμφάνιση γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο του συστήματος ανοσοανίχνευσης ECL Plus (Amersham).



Εικόνα 14. Συνοπτική παρουσίαση των διαδικασιών ηλεκτρομεταφοράς, ανοσοανίχνευσης και εμφάνισης του σήματος.

Πρότυπη καμπύλη Bradford με BSA (bovine serum albumin)

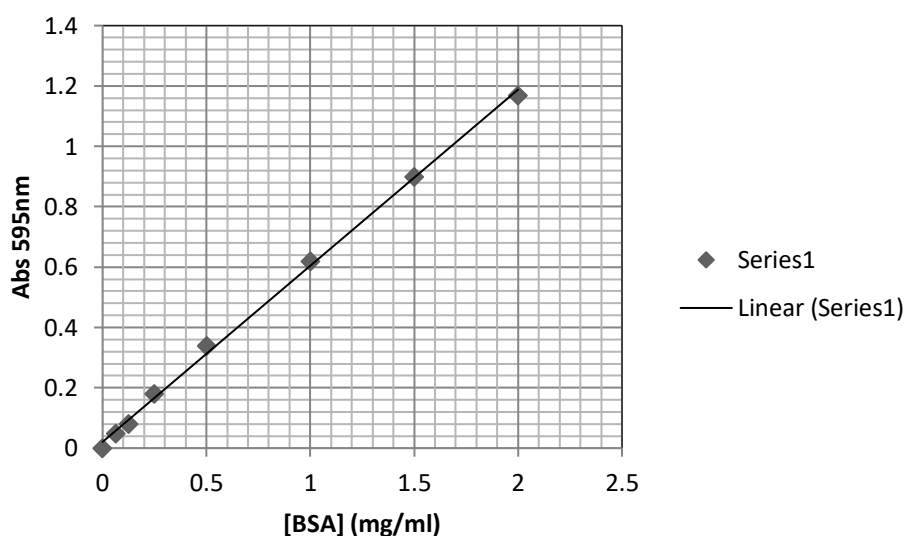
Από stock διαλύματος πρωτεΐνης BSA 2mg/ml, παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης (0 μέχρι 2,00mg/ml) και στη συνέχεια έγινε επώαση των διαλυμάτων με το αντιδραστήριο Bradford για τουλάχιστον 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Η πρότυπη καμπύλη έγινε μετρώντας τις απορροφήσεις των διαλυμάτων στα 595nm με τη βοήθεια του φωτόμετρου. Όπως φαίνεται στην εικόνα 15, προκύπτει μια γραμμική σχέση με εξίσωση:

$$A = 0,6744 \times C + 0,0536$$

Όπου:

A η απορρόφηση του δείγματος στα 595nm, και

C η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού δείγματος σε mg/ml.



Εικόνα 15. Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης BSA με τη μέθοδο Bradford

Με τη βοήθεια της εξίσωσης που προέκυψε, υπολογίστηκε η ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών στα δείγματα της πειραματικής διαδικασίας.

Φωτομέτρηση δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης πρωτεϊνών

- 1) Επώαση 10μl δείγματος πρωτεΐνης σε 1ml αντιδραστηρίου Bradford για 5min,
- 2) Φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 595nm.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

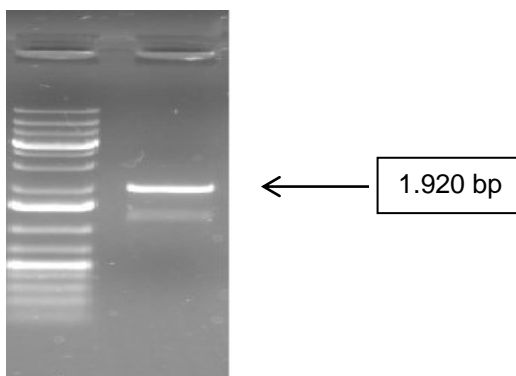
4.1. Αλληλούχιση του DNA του μεταλλάγματος PARN E30A

Το πλασμίδιο pET-33 b, μετά την στοχευμένη μεταλλαξιγένεση για την σύνθεση του μεταλλάγματος PARN E30A (βλέπε Ενότητα 3.1.), αποστάλθηκαν για αλληλούχιση. Η αλληλουχία που ανακτήθηκε φέρει επιτυχώς την επιθυμητή σημειακή μετάλλαξη, κατά την οποία το νουκλεοτίδιο αδερίνη (A) της τριπλέτας GAG, που κωδικοποιεί το αμινοξύ Γλουταμίνη στη θέση 30 του ενεργού κέντρου της PARN, αντικαταστάθηκε με μία κυτοσίνη (C), με αποτέλεσμα να προκύπτει η τριπλέτα GCG, που κωδικοποιεί το αμινοξύ Αλανίνη. Η αλληλουχία του μεταλλάγματος PARN E30A παρουσιάζεται αμέσως παρακάτω:

```
PARN WT 61   GAGGCCGACTTCTTCGCCATCGATGGGGAGTTCAGGAATCAGTGATGGACCTTCAGTC 120
              |||||||
E30A  61     GAGGCCGACTTCTTCGCCATCGATGGGGCGTTCAGGAATCAGTGATGGACCTTCAGTC 120
```

4.2. Ηλεκτροφόρηση του DNA του μεταλλάγματος PARN E30A σε πηκτή αгарόζης

Η επαλήθευση ότι το DNA του μεταλλάγματος PARN E30A έχει ενισχυθεί ειδικά προκειμένου να κλωνοποιηθεί στον πλασμδιακό φορέα pcDNA4/TO (βλέπε Ενότητα 3.2.), πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Η ηλεκτροφόρηση του DNA που ενισχύθηκε έγινε σε gel αгарόζης 1%. Όπως φαίνεται στην εικόνα 1 παρακάτω πήραμε ένα τμήμα DNA μήκους 1.920 bp, το οποίο αντιστοιχεί στο DNA του μεταλλάγματος PARN E30A.

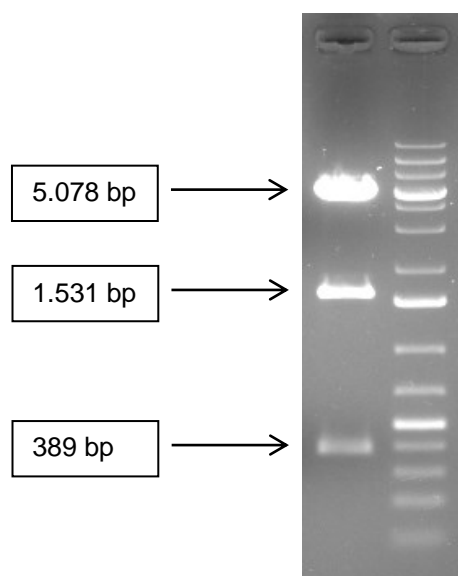


Εικόνα 1: Ηλεκτροφόρηση του ενισχυμένου DNA του μεταλλάγματος PARN E30A

Η επιτυχία της κλωνοποίησης της E30A στον πλασμιδιακό φορέα pCDNA4/TO επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση του πλασμιδιακού DNA, που απομονώθηκε από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν μετά τον μετασχηματισμό των επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων.

4.3. Ηλεκτροφόρηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pCDNA4/TO μετά από πέψη με το ένζυμο περιορισμού EcoRI

Η επιβεβαίωση της εισαγωγής του μεταλλάγματος PARN E30A στο πλασμίδιο pCDNA4/TO πραγματοποιήθηκε με την ηλεκτροφόρηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pCDNA4/TO, μετά από την πέψη του με το ένζυμο περιορισμού EcoRI (βλέπε Ενότητα 3.2.). Το ένζυμο περιορισμού EcoRI αναγνωρίζει μία αλληλουχία G|AATTC στην περιοχή πολυσυνδέτη του πλασμιδίου pCDNA4/TO και άλλη μία αλληλουχία G|AATTC εσωτερικά της PARN E30A, με αποτέλεσμα όπως φαίνεται και την εικόνα 2 να προκύπτουν 3 τμήματα DNA μήκους 5.078 bp, 1.531 bp και 389 bp.



Εικόνα 2: Ηλεκτροφόρηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pCDNA4/TO, που φέρει το DNA του μεταλλάγματος PARN E30A, μετά από πέψη με το ένζυμο περιορισμού EcoRI.

4.4. Έλεγχος της υπερέκφρασης της PARN WT και PARN E30A σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης

Αρχικά έγινε υπερέκφραση της PARN WT και του μεταλλάγματος PARN E30A, σε καρκινικά κύτταρα NCI-H520. Για το σκοπό αυτό έγινε διαμόλυνση με 2 διαφορετικά ανασυνδυασμένα πλασμίδια pcDNA4/TO, τα οποία φέρουν το cDNA της PARN WT και της PARN E30A, αντίστοιχα. Τα σχετικά πρωτόκολλα διαμόλυνσης και επαγωγής της γονιδιακής έκφρασης παρουσία τετρακυκλίνης περιγράφονται στις ενότητες 3.2. και 3.3. Ως μάρτυρας της αποτελεσματικότητας και της εξειδίκευσης της διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα NCI-H520 διαμολυσμένα με πλασμίδιο pcDNA4/TO που δεν φέρει κάποιο ένθεμα (Mock). Έτσι, μπορούν να εξεταστούν και να ελεγχθούν οι όποιες μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των PARN WT και PARN E30A οφείλονται στην διαδικασία της διαμόλυνσης καθ' αυτή.

Προέκυψαν έτσι, 3 διαφορετικά δείγματα κυττάρων:

- 1) Κύτταρα Mock:** Κύτταρα NCI-H520 διαμολυσμένα με μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4/TO.
- 2) Κύτταρα PARN WT:** Κύτταρα NCI-H520 διαμολυσμένα με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4/TO, το οποίο φέρει το cDNA της PARN WT.
- 3) Κύτταρα PARN E30A:** Κύτταρα NCI-H520 διαμολυσμένα με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4/TO, το οποίο φέρει το cDNA του μεταλλάγματος PARN E30A.

Έπειτα, από τα παραπάνω δείγματα κυττάρων έγινε απομόνωση του ολικού RNA και των πρωτεϊνών σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο Ενότητα 3.4.

Αρχικά, τα εκχυλίσματα RNA που ανακτήθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης του mRNA της PARN, με την βοήθεια της συγκριτικής ποσοτικής Real Time PCR (Comparative qRT-PCR) και της μεθόδου ΔΔCt (βλέπε Ενότητα 3.5). Η αλλαγή στην έκφραση του mRNA, τόσο στην περίπτωση της PARN WT, όσο και του μεταλλάγματος PARN E30A, κανονικοποιήθηκε με τα επίπεδα έκφρασής του mRNA του ιδιοσυστατικού γονιδίου αναφοράς, την β-ακτίνη. Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν τα σφάλματα, οι αντιδράσεις για την ποσοτικοποίηση των mRNAs πραγματοποιήθηκαν σε triplicates.

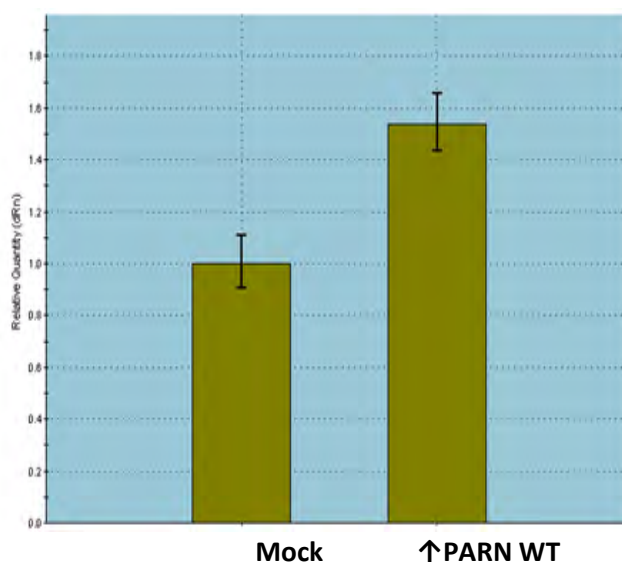
Στη συνέχεια, ο ποιοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με την διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (βλέπε Ενότητα 3.6.). Η αλλαγή στην έκφραση της πρωτεΐνης, τόσο στην περίπτωση της PARN WT, όσο και του μεταλλάγματος

PARN E30A, κανονικοποιήθηκε με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης του ιδιοσυστατικού γονιδίου αναφοράς, την β-ακτίνη.

Υπερέκφραση της PARN WT σε κύτταρα NCI-H520.

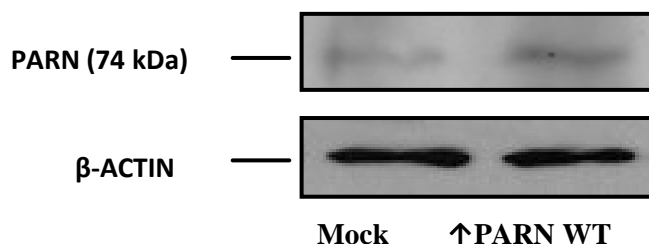
Στις εικόνες 3 και 4 παρατηρούμε την αποτελεσματικότητα της υπερέκφρασης της PARN WT σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης, αντίστοιχα, σε κύτταρα NCI-H520, σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα που παρατηρούνται στα Mock κύτταρα.

Στο εκχύλισμα των κυττάρων με υπερεκφρασμένη την PARN WT τα επίπεδα του mRNA της PARN παρατηρήθηκε να είναι αυξημένα κατά 33%, σε σχέση με τα αντίστοιχα που παρατηρήθηκαν στα Mock κύτταρα (Εικόνα 3). Για κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις (triplicates).



Εικόνα 3. Υπερέκφραση PARN WT σε κύτταρα NCI-H520. Διαμόλυνση κυττάρων NCI-H520 με pcDNA4/TO χωρίς ένθεμα (Mock) και με ένθεμα για έκφραση PARN φυσικής μορφής (↑PARN WT). Τα αποτελέσματα ανακτήθηκαν από το διάγραμμα Relative Quantitative Chart.

Στο εκχύλισμα των κυττάρων με υπερεκφρασμένη την PARN WT παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης PARN, σε σχέση με την αντίστοιχη που παρουσίασαν τα Mock κύτταρα (Εικόνα 4).

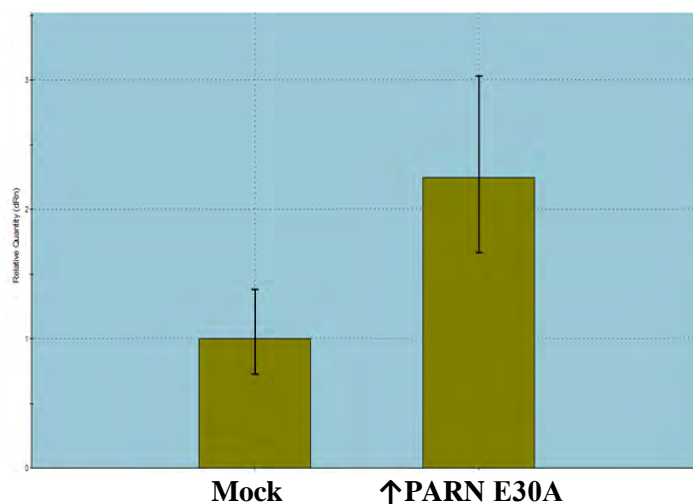


Εικόνα 4. Επίδραση της υπερέκφρασης της απαδενυλάσης PARN WT στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης PARN (74 kDa) σε κύτταρα NCI-H520. Ως control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα NCI-H520 (Mock), τα οποία διαμολύνθηκαν με μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4/TO.

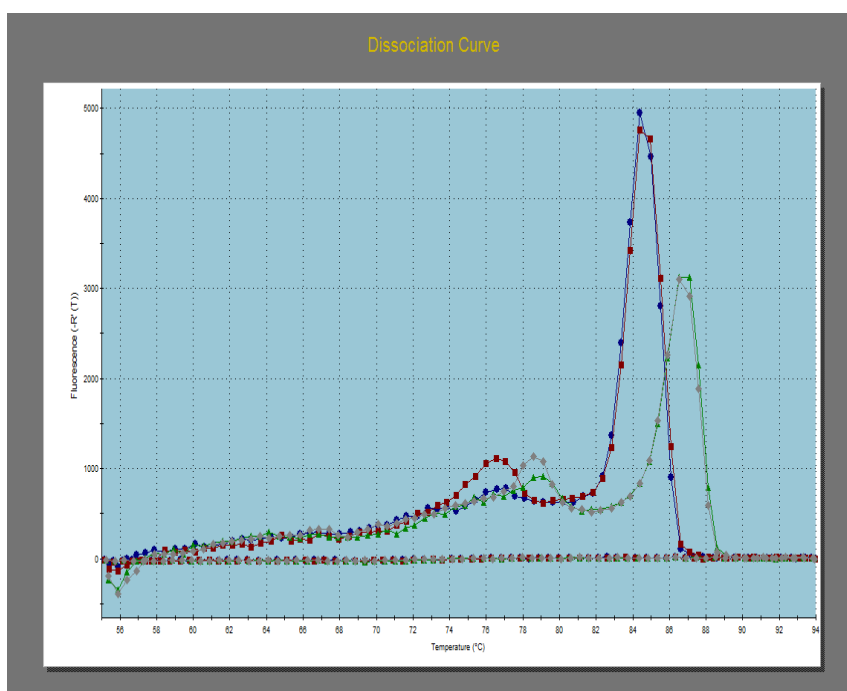
Υπερέκφραση του μεταλλάγματος PARN E30A σε κύτταρα NCI-H520.

Στις εικόνες 5 και 7 παρατηρούμε την αποτελεσματικότητα της υπερέκφρασης του μεταλλάγματος PARN E30A σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης αντίστοιχα σε κύτταρα NCI-H520, σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα που παρατηρούνται στα Mock κύτταρα.

Στο εκχύλισμα των κυττάρων με υπερεκφρασμένη την PARN E30A τα επίπεδα του mRNA της PARN παρατηρήθηκε να είναι αυξημένα κατά 55%, σε σχέση με τα αντίστοιχα που παρατηρήθηκαν στα Mock κύτταρα (Εικόνα 5). Για κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις (triplicates).

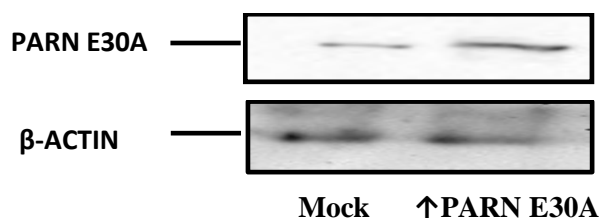


Εικόνα 5. Υπερέκφραση PARN E30A σε κύτταρα NCI-H520. Διαμόλυνση κυττάρων NCI-H520 με pcDNA4/TO χωρίς ένθεμα (Mock) και με ένθεμα για έκφραση PARN E30A (↑PARN E30A). Επίδραση της υπερέκφρασης του μεταλλάγματος PARN E30A σε επίπεδο mRNA της PARN σε κύτταρα NCI-H520. Τα αποτελέσματα ανακτήθηκαν από το διάγραμμα Relative Quantitative Chart.



Εικόνα 6. Υπερέκφραση μεταλλάγματος PARN E30A. Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού (Dissociation Curve). Οι καμπύλες με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 84 °C αντιπροσωπεύουν τα προϊόντα από τα κύτταρα στα οποία έγινε υπερέκφραση του μεταλλάγματος PARN E30A, ενώ η δεύτερη καμπύλη με μέγιστη ένταση φθορισμού σε θερμοκρασία 87°C, αντιστοιχεί στα προϊόντα της β-ακτίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 75°C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 80°C αντιστοιχούν σε ειδικά προϊόντα της PCR.

Στο εκχύλισμα των κυττάρων με υπερεκφρασμένη την PARN E30A παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης PARN, σε σχέση με την αντίστοιχη που παρουσίασαν τα Mock κύτταρα (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Υπερέκφραση του μεταλλάγματος PARN E30A σε επίπεδο πρωτεΐνης σε κύτταρα NCI-H520. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα NCI-H520 (Mock), τα οποία διαμολύνθηκαν με μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4/TO.

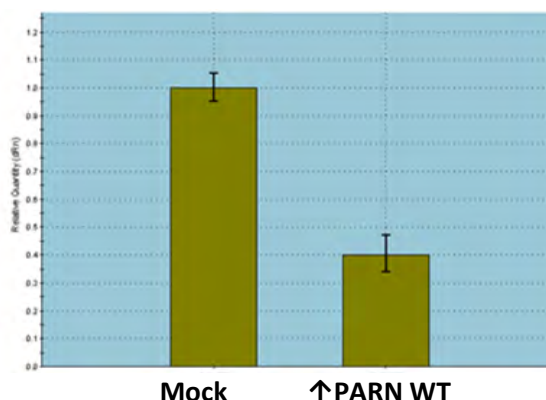
4.5. Έλεγχος των επιπέδων των pri-miRs (pri-miR-29a, pri-miR-1207) και miRs (miR-29a, miR-1207) μετά από υπερέκφραση της PARN WT και της PARN E30A

Όπως αναφέρθηκε, μεταξύ των microRNAs των οποίων τα επίπεδα επηρεάζονται από την PARN είναι τα miR-29a και miR-1207. Προκειμένου να εξετάσουμε τον πιθανό ρόλο της PARN στα πρώτα στάδια της βιοσύνθεσης των microRNAs, επιλέξαμε να μελετήσουμε τα επίπεδα έκφρασης των pri-miRs (pri-miR-29a, pri-miR-1207) και των miRs (miR-29a, miR-1207), μετά από υπερέκφραση της PARN WT και του μεταλλάγματος PARN E30A. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε συγκριτική ποσοτική Real Time PCR (Comparative qRT-PCR) με τη μέθοδο $\Delta\Delta C_t$ (βλέπε Ενότητα 3.5), με την οποία η κανονικοποίηση γίνεται με τη βοήθεια ιδιοσυστατικών γονιδίων αναφοράς. Με την εν λόγω μέθοδο, τα επίπεδα των miRNAs καθορίστηκαν συγκριτικά με τα επίπεδα του γονιδίου αναφοράς U6. Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν τα σφάλματα, οι αντιδράσεις για την ποσοτικοποίηση των miRNAs πραγματοποιήθηκαν σε duplicates.

Επίπεδα έκφρασης του pri-miR-29a μετά από υπερέκφραση της PARN WT

Στην εικόνα 8 παρουσιάζεται η επίδραση που είχε η υπερέκφραση της PARN WT στα επίπεδα έκφρασης του pri-miR-29a σε κύτταρα NCI-H520, σε σχέση με τα αντίστοιχα που παρατηρούνται στα κύτταρα Mock.

Στα κύτταρα PARN WT, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης του pri-miR-29a κατά 60%, σε σχέση με την αντίστοιχη που παρατηρήθηκε στα Mock κύτταρα (Εικόνα 8). Για κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις (duplicates).



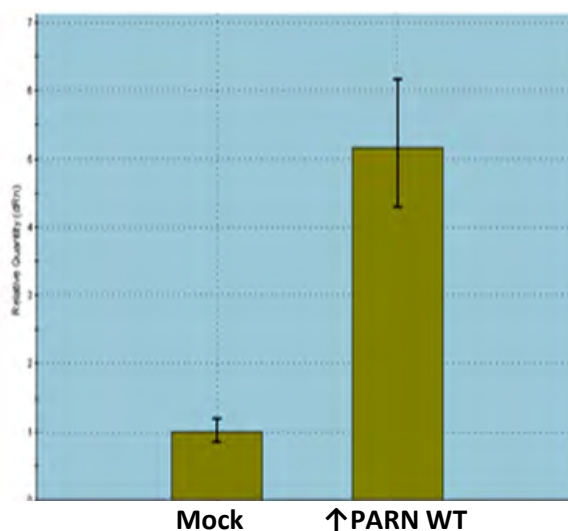
Εικόνα 8. Επίπεδα έκφρασης του pri-miR-29a μετά από υπερέκφραση της PARN WT (↑ PARN WT) σε κύτταρα NCI-H520, όπως ανακτήθηκαν από το Relative Quantitative Chart. Ως control

χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα NCI-H520 (Mock), τα οποία διαμολύνθηκαν με μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4/TO.

Επίπεδα έκφρασης του miR-29a μετά από υπερέκφραση της PARN WT

Στην εικόνα 9 παρουσιάζεται η επίδραση που είχε η υπερέκφραση της PARN WT στα επίπεδα έκφρασης του miR-29a σε κύτταρα NCI-H520, σε σχέση με τα αντίστοιχα που παρατηρούνται στα κύτταρα Mock.

Στα κύτταρα PARN WT, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του miR-29a κατά 5 φορές (περίπου 400%), σε σχέση με την αντίστοιχη που παρατηρήθηκε στα Mock κύτταρα (Εικόνα 9). Για κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις (duplicates).

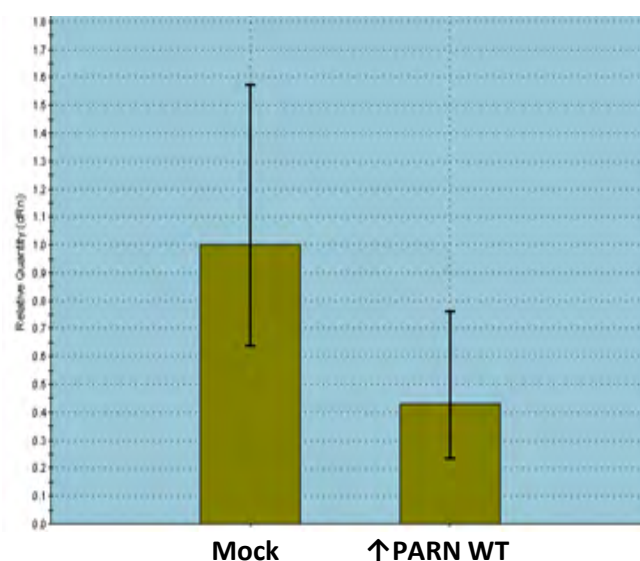


Εικόνα 9. Επίπεδα έκφρασης του miR-29a μετά από υπερέκφραση της PARN WT σε κύτταρα NCI-H520, όπως ανακτήθηκαν από το Relative Quantitative Chart. Ως control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα NCI-H520 (Mock), τα οποία διαμολύνθηκαν με μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4/TO.

Επίπεδα έκφρασης του pri-miR-1207 μετά από υπερέκφραση της PARN WT

Στην εικόνα 10 παρουσιάζεται η επίδραση που είχε η υπερέκφραση της PARN WT στα επίπεδα έκφρασης του pri-miR-1207 σε κύτταρα NCI-H520, σε σχέση με τα αντίστοιχα που παρατηρούνται στα κύτταρα Mock.

Στα κύτταρα PARN WT, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης του pri-miR-1207 κατά 60%, σε σχέση με την αντίστοιχη που παρατηρήθηκε στα Mock κύτταρα (Εικόνα 10). Για κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις (duplicates).

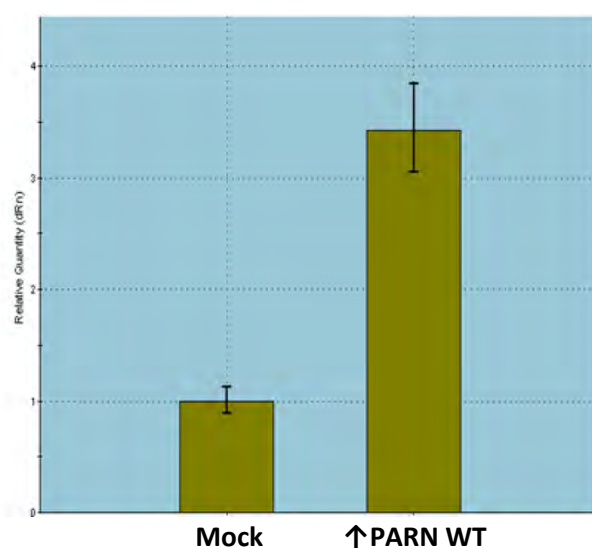


Εικόνα 10. Επίπεδα έκφρασης του pri-miR-1207 μετά από υπερέκφραση της PARN WT σε κύτταρα NCI-H520, όπως ανακτήθηκαν από το Relative Quantitive Chart. Ως control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα NCI-H520 (Mock), τα οποία διαμολύνθηκαν με μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4/TO.

Επίπεδα έκφρασης του miR-1207 μετά από υπερέκφραση της PARN WT

Στην εικόνα 11 παρουσιάζεται η επίδραση που είχε η υπερέκφραση της PARN WT στα επίπεδα έκφρασης του miR-1207 σε κύτταρα NCI-H520, σε σχέση με τα αντίστοιχα που παρατηρούνται στα κύτταρα Mock.

Στα κύτταρα PARN WT παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του miR-1207 κατά 240%, σε σχέση με την αντίστοιχη που παρατηρήθηκε στα Mock κύτταρα (Εικόνα 11). Για κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις (duplicates).

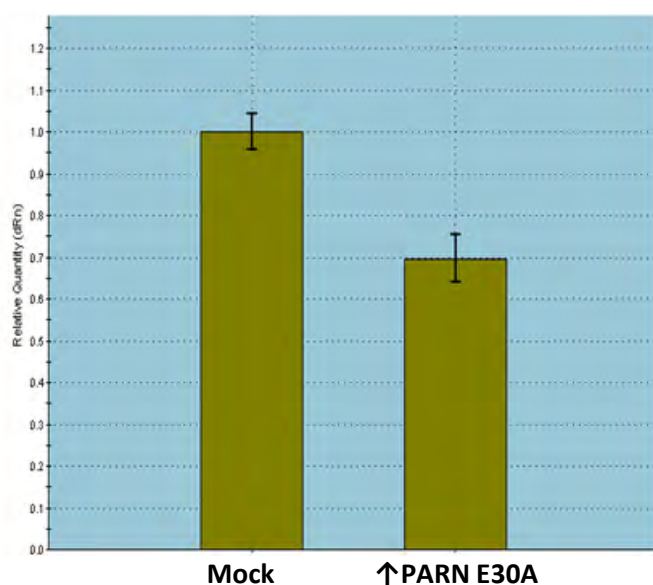


Εικόνα 11. Επίπεδα του miR-1207 μετά από υπερέκφραση της PARN WT σε κύτταρα NCI-H520, όπως ανακτήθηκαν από το Relative Quantitative Chart. Ως control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα NCI-H520 (Mock), τα οποία διαμολύνθηκαν με μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4/TO.

Επίπεδα έκφρασης του pri-miR-29a μετά από υπερέκφραση της PARN E30A

Στην εικόνα 12 παρουσιάζεται η επίδραση που είχε η υπερέκφραση του μεταλλάγματος PARN E30A στα επίπεδα έκφρασης του pri-miR-29a σε κύτταρα NCI-H520, σε σχέση με τα αντίστοιχα που παρατηρούνται στα κύτταρα Mock.

Στα κύτταρα PARN E30A, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης του pri-miR-29a κατά 30%, σε σχέση με την αντίστοιχη που παρατηρήθηκε στα Mock κύτταρα (Εικόνα 12). Για κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις (duplicates).

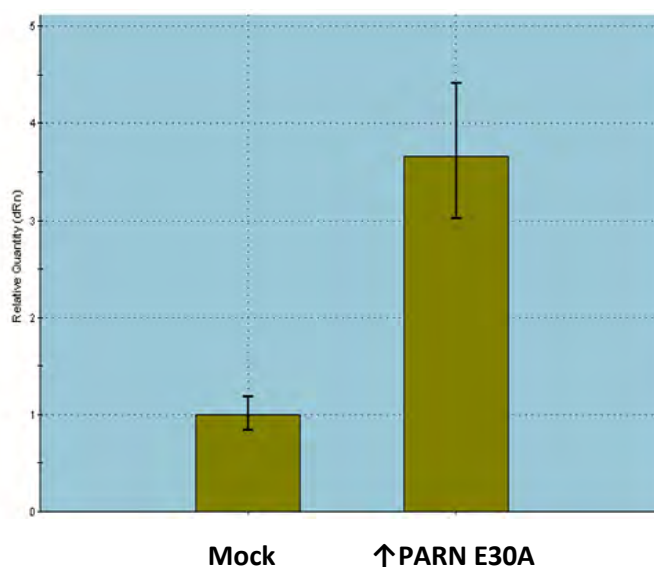


Εικόνα 12. Επίπεδα του pri-miR-29a μετά από υπερέκφραση της PARN E30A σε κύτταρα NCI-H520, όπως ανακτήθηκαν από το Relative Quantitative Chart. Ως control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα NCI-H520 (Mock), τα οποία διαμολύνθηκαν με μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4/TO.

Επίπεδα έκφρασης του miR-29a μετά από υπερέκφραση της PARN E30A

Στην εικόνα 13 παρουσιάζεται η επίδραση που είχε η υπερέκφραση του μεταλλάγματος PARN E30A στα επίπεδα έκφρασης του miR-29a σε κύτταρα NCI-H520, σε σχέση με τα αντίστοιχα που παρατηρούνται στα κύτταρα Mock.

Στα κύτταρα PARN E30A, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του miR-29a κατά 273%, σε σχέση με την αντίστοιχη που παρατηρήθηκε στα Mock κύτταρα (Εικόνα 13). Για κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις (duplicates).

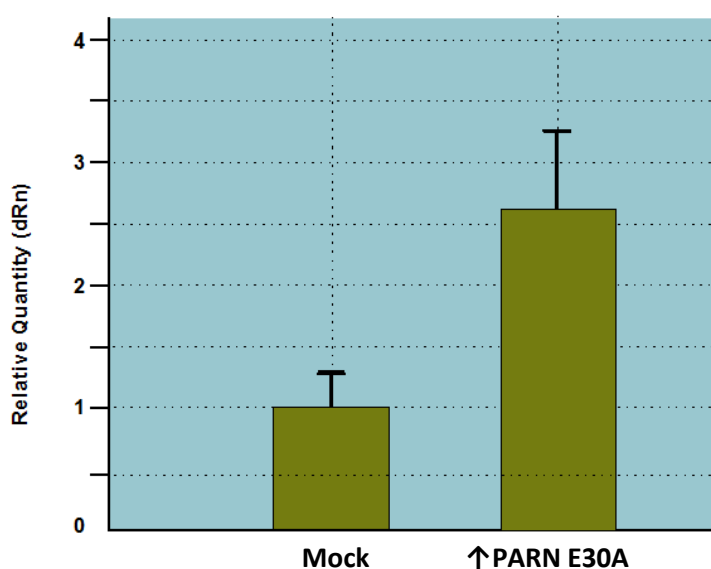


Εικόνα 13. Επίπεδα του miR-29a μετά από υπερέκφραση της PARN E30A σε κύτταρα NCI-H520, όπως ανακτήθηκαν από το Relative Quantitative Chart. Ως control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα NCI-H520 (Mock), τα οποία διαμολύνθηκαν με μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4/TO.

Επίπεδα έκφρασης του pri-miR-1207 μετά από υπερέκφραση της PARN E30A

Στην εικόνα 14 παρουσιάζεται η επίδραση που είχε η υπερέκφραση του μεταλλάγματος PARN E30A στα επίπεδα έκφρασης του pri-miR-1207 σε κύτταρα NCI-H520, σε σχέση με τα αντίστοιχα που παρατηρούνται στα κύτταρα Mock.

Στα κύτταρα PARN E30A, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του pri-miR-1207 κατά 263%, σε σχέση με την αντίστοιχη που παρατηρήθηκε στα Mock κύτταρα (Εικόνα 14). Για κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις (duplicates).

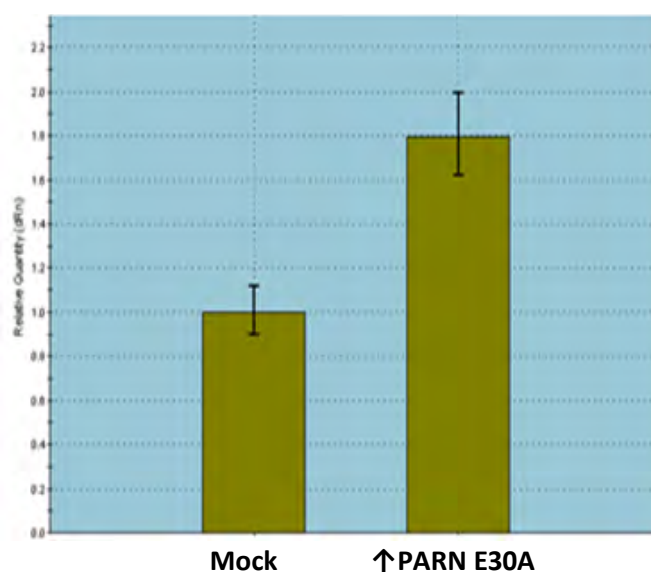


Εικόνα 14. Επίπεδα του pri-miR-1207 μετά από υπερέκφραση της PARN E30A σε κύτταρα NCI-H520, όπως ανακτήθηκαν από το Relative Quantitive Chart. Ως control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα NCI-H520 (Mock), τα οποία διαμολύνθηκαν με μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4/TO.

Επίπεδα έκφρασης του miR-1207 μετά από υπερέκφραση της PARN E30A

Στην εικόνα 15 παρουσιάζεται η επίδραση που είχε η υπερέκφραση της PARN E30A στα επίπεδα έκφρασης του miR-1207 σε κύτταρα NCI-H520, σε σχέση με τα αντίστοιχα που παρατηρούνται στα κύτταρα Mock.

Στα κύτταρα PARN E30A, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του miR-1207 κατά 80%, σε σχέση με την αντίστοιχη που παρατηρήθηκε στα Mock κύτταρα (Εικόνα 15). Για κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις (duplicates).



Εικόνα 15. Επίπεδα έκφρασης του miR-1207 μετά από υπερέκφραση της PARN E30A σε κύτταρα NCI-H520, όπως ανακτήθηκαν από το Relative Quantitative Chart. Ως control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα NCI-H520 (Mock), τα οποία διαμολύνθηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4/TO που περιέχει τη μετάλλαξη της PARN E30A.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί πως τα δεδομένα που εκτίθενται στην παρούσα εργασία και αφορούν στα miR-29a, pri-miR-29a, miR-1207 και pri-miR-1407 αποτελούν μια πρώτη εκτίμηση, καθώς πραγματοποιήθηκε ως το παρόν, ένα μόνο πείραμα.

Πίνακας 1. Σύνοψη των μεταβολών στα επίπεδα έκφρασης των πρώιμων και ώριμων microRNAs που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία.

	Μεταβολή επιπέδων έκφρασης %			
Υπερέκφραση	pri-miR-29a	miR-29a	pri-miR-1207	miR-1207
PARN WT	-60	+400	-60	+240
PARN E30A	-30	+273	+263	+80
Μεταβολή WT-E30A	+30	-127	+323	-160

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία, μελετάται η αλληλεπίδραση της μεταλλαγμένη PARN E30A, σε σχέση με την PARN φυσικού τύπου (WT), με το miR 29a και το miR 1207, τα οποία πρόσφατα έχει αποδειχθεί πως παρουσιάζουν ογκοκατασταλτική και ογκογόνο δράση αντίστοιχα (Jiang et al., 2014; Wu et al., 2015). Παράλληλα, πρόσφατες μελέτες από το εργαστήριό μας (Σκουτέλικ Ν., 2013) έδειξαν, πως μετά από αποσιώπηση της απαδενυλάσης PARN, και εξέταση της επίδρασης της αποσιώπησης της στην έκφραση ολόκληρου του miRNome του κυττάρου με μικροσυστοιχίες miRNA, προέκυψε μία σειρά από miRNAs με διαφορετική έκφραση μετά την αποσιώπηση. Στη συνέχεια για τα συγκεκριμένα miRNAs που προέκυψαν, εξετάστηκε ο κυτταρικός ρόλος τους και η πιθανή εμπλοκή τους σε καρκίνους, στη βιβλιογραφία. Επίσης, προσδιορίστηκαν με μεθόδους *in silico*, οι πιθανοί mRNA-στόχοι τους. Για την οικογένεια hsa-miR-29, βρέθηκε τα μέλη της 29a, 29b, και 29c να έχουν μειωμένη έκφραση στον καρκίνο του πνεύμονα, σε σχέση με υγιή κύτταρα (Fabbri et al. 2007), με το miR-29a να επιδεικνύει επίσης απορρυθμισμένη έκφραση σε αδenoκαρκίνωμα του πνεύμονα (Lin et al. 2012). Παράλληλα, από την εξέταση των πιθανών στόχων των miRNAs αυτών, προέκυψε πως μερικά από αυτά στοχεύουν τους ίδιους παράγοντες, οι οποίοι προκάλεσαν την αλλαγή της έκφρασής τους, δηλαδή την PARN. Οι ενδείξεις ότι τα miRNAs που προκύπτουν με αυτό τον τρόπο, δηλαδή το miR-29a και το miR-1207, ίσως να εμπλέκονται μέσω αλληλεπίδρασής τους με την απαδενυλάση PARN σε ογκογόνες κυτταρικές διεργασίες, μας έκανε να προβούμε στο επόμενο βήμα, που είναι να μελετήσουμε την πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ των παραπάνω microRNAs και των πρόδρομων μορίων τους (pri-miR-29a και pri-miR-1207) με την μεταλλαγμένη απαδενυλάση PARN E30A, σε σχέση με την PARN WT.

Για το σκοπό αυτό, υπερεκφράσαμε την απαδενυλάση PARN WT και την PARN E30A σε καρκινικά κύτταρα NCI-H520, και εξετάσαμε την επίδραση της υπερέκφρασής τους στα επίπεδα έκφρασης των pri-miRs (pri-miR-29a, pri-miR-1207) και των miRs (miR-29a, miR-1207) με συγκριτική ποσοτική Real Time PCR (Comparative qRT-PCR). Αρχικά η υπερέκφραση των PARN WT και PARN E30A επιβεβαιώθηκε με qRT-PCR, με τα επίπεδα του mRNA της PARN στο εκχύλισμα κυττάρων με υπερεκφρασμένη την PARN WT, να είναι αυξημένα κατά 33% (Ενότητα 4.4. Εικόνα 3), ενώ τα επίπεδα του mRNA της PARN σε εκχύλισμα κυττάρων με υπερεκφρασμένη την PARN E30A, να είναι αυξημένα κατά 55% (Ενότητα 4.4. Εικόνα 5), σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα που παρατηρούνται στα κύτταρα Mock. Αντίστοιχα, ο έλεγχος της πρωτεΐνης PARN με ανοσοαποτύπωση, μετά από υπερέκφραση της PARN WT και PARN E30A, έδειξε αύξηση

της έκφρασης της πρωτεΐνης τόσο στο εκχύλισμα των κυττάρων με υπερέκφρασμένη την PARN WT (Ενότητα 4.4. Εικόνα 4), όσο και στο εκχύλισμα των κυττάρων με υπερέκφρασμένη την PARN E30A (Ενότητα 4.4. Εικόνα 7), σε σχέση με τα επίπεδα πρωτεΐνης PARN που παρουσίασαν τα Mock κύτταρα.

Ακολούθως εξετάστηκαν τα επίπεδα των pri-miR-29a και miR-29a, καθώς και των pri-miR-1207 και miR-1207 μετά από υπερέκφραση των PARN WT και PARN E30A. Τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν στις Εικόνες 8-15 και συνοψίζονται στον ακόλουθο Πίνακα.

Πίνακας. Σύνοψη των μεταβολών στα επίπεδα έκφρασης των πρώιμων και ώριμων microRNAs που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία.

	Μεταβολή επιπέδων έκφρασης %			
Υπερέκφραση	pri-miR-29a	miR-29a	pri-miR-1207	miR-1207
PARN WT	-60	+400	-60	+240
PARN E30A	-30	+273	+263	+80
Μεταβολή WT-E30A	+30	-127	+323	-160

Από τη σύγκριση των δεδομένων του Πίνακα προκύπτουν τα εξής:

1. Η υπερέκφραση της PARN WT προκαλεί μεγαλύτερη μείωση των πρώιμων μορφών σε σχέση με αυτή της PARN E30A. Έτσι:
 - i. Τα επίπεδα του pri-miR-29a, μειώνονται κατά 30 και 60%, παρουσία της PARN E30A και PARN WT (μεταβολή κατά +30%), αντίστοιχα, και
 - ii. τα επίπεδα του pri-miR-1207 μειώνονται κατά 60% παρουσία της PARN WT και αυξάνονται κατά 263% παρουσία της PARN E30A (μεταβολή κατά +323%).
2. Η υπερέκφραση της PARN WT προκαλεί αύξηση των ώριμων miRs και μείωση των πρώιμων μορφών. Η υπερέκφραση της καταλυτικά ανενεργής PARN E30A μειώνει τις προηγούμενες διαφορές. Δηλαδή
 - i. τα επίπεδα του ώριμου miR-29a αυξάνονται κατά 400% παρουσία της PARN WT, αντί 273% παρουσία της PARN E30A (μεταβολή κατά 127%).
 - ii. τα επίπεδα του ώριμου miR-1207 αυξάνονται κατά 240% παρουσία της PARN WT, αντί 80% παρουσία της PARN E30A (μεταβολή κατά 160%).

Τα παραπάνω μπορεί πιθανόν να σημαίνουν πως παρουσία της PARN E30A ωριμάζει μικρότερη ποσότητα pri-miRs (στήλη pri-miR-29a και στήλη pri-miR-1207) και άρα τα επίπεδα των ώριμων miRs είναι μειωμένα σε σχέση με αυτά της PARN WT. Αυτό

πιθανόν οφείλεται στον ανταγωνισμό της φυσικής με τη μεταλλαγμένη PARN για πρόσδεση με τις πρώιμες μορφές των miRs (για την πρόσδεση της PARN με ώριμες μορφές miRs, βλέπε στην τελευταία παράγραφο της ενότητας παρακάτω). Επιπλέον, ενισχύει την υπόθεση πως η PARN συμβάλλει στην ωρίμανση των pri-miRs σε ώριμα miRs.

Η μειωμένη παραγωγή των ώριμων miRs, μετά από υπερέκφραση της μεταλλαγμένης PARN E30A, σε σχέση με την PARN WT, μπορεί να οφείλεται στην ήδη υπάρχουσα PARN WT στα κύτταρα. Σε κάθε περίπτωση που εξετάστηκε, η αύξηση των επιπέδων της PARN WT αυξάνει τα επίπεδα των ώριμων miRs, πιθανόν λόγω του αυξημένου ρυθμού ωρίμανσης των υπαρχόντων pri-miRs. Ο ρυθμός αυτός μειώνεται στην περίπτωση της διαμόλυνσης με την καταλυτικά ανενεργή PARN E30A. Επίσης, προκαταρκτικές μελέτες από το εργαστήριό μας έδειξαν πως τόσο το miR-29a, όσο και το miR-1207 στοχεύουν το ίδιο το mRNA της PARN, και μειώνουν τα επίπεδά της. Έτσι, σε ένα δεύτερο επίπεδο ανάλυσης, μπορεί να υποθεθεί πως η υπερέκφραση της PARN E30A δεν επιτρέπει σε έναν πληθυσμό πρώιμων pri-miR-1207 να ωριμάσει σε miR-1207, τα οποία θα μπορούσαν να προκαλέσουν αυξημένη αποικοδόμηση του mRNA της ενδογενούς PARN. Σε αυτά τα παραμένοντα επίπεδα της ενδογενούς PARN οφείλεται η συνέχιση της ωρίμανσης των pri-miRs σε ώριμα miRs ακόμη παρουσία της PARN E30A. Με το παραπάνω αποτέλεσμα της παρούσας εργασίας συνηγορούν πρόσφατες μελέτες με ανοσοαποτύπωση από το εργαστήριό μας (Σκουτέλικ N., 2013), οι οποίες έδειξαν πως μετά από υπερέκφραση του miR-1207 παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης PARN. Το γεγονός αυτό ενισχύει την υπόθεση του πιθανού αρνητικού ελέγχου που ασκεί το miR-1207 στην PARN.

Το βασικότερο συμπέρασμα από τα πειράματα που παρουσιάστηκαν σε αυτή την εργασία, και σε συνδυασμό με προκαταρκτικές μελέτες μας, είναι πως η PARN συμμετέχει στη βιοσύνθεση των microRNAs, πιθανόν μάλιστα στα πρώτα στάδια της διαδικασίας. Τα αποτελέσματά μας επεκτείνουν πρόσφατη έρευνα που δείχνει πως το ένζυμο που απαιτείται για την επεξεργασία του 3' άκρου του πρόδρομου μορίου ac-pre-miRNA, ώστε να παραχθεί το ώριμο miR-451, είναι η PARN (Yoda et al, 2013). Επιπλέον έχει αναφερθεί πως η απαδενυλίωση της 3' ουράς (1-3 νουκλεοτίδια αδερίνης) του πρόδρομου μορίου AgoshRNA (<19bp) πραγματοποιείται από την PARN, οδηγώντας στην παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA με δομή φουρκέτας (short hairpin RNA –shRNA) (Harwig et al, 2015).

Εν συνεχεία, από τα δεδομένα που προκύπτουν ότι η δράση των δύο miRs ενορχηστρώνεται με αυτή των απαδενυλασών, και ότι ίσως αυτά στοχεύουν το mRNA της PARN ή στοχεύονται από την πρωτεΐνη της PARN.. Εφόσον δεν έχει εξεταστεί σε βάθος ο ρόλος της PARN στον μηχανισμό της βιοσύνθεσης των microRNAs, έγινε μία προσπάθεια ελέγχου της άμεσης αλληλεπίδρασης της απαδενυλάσης PARN με πιθανά μόρια RNA με ανοσοκατακρήμιση RNA με αντίσωμα έναντι της PARN. Έτσι, σε εκχυλίσματα κυττάρων NCI-H520, όπου έγινε συγκατακρήμιση της PARN με τα προσδεδεμένα σε αυτή μόρια RNA, ελέγχθηκαν τα επίπεδα του miR-29a. Τα αποτελέσματα που ανακτήθηκαν από τις qRT-PCR, μαρτυρούν την παρουσία του miR-29a στο κυτταροπλασματικό εκχύλισμα, στο οποίο ήταν 650% αυξημένο σε σχέση με το control του κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος. Αυτό που προκαλεί εντύπωση είναι ότι στο πυρηνικό εκχύλισμα το miR-29a ήταν αυξημένο πάρα πολύ (180 φορές πάνω) σε σχέση με το control του πυρηνικού εκχυλίσματος. Έτσι, προκύπτουν δύο δεδομένα: 1) το miR-29a αλληλεπιδρά άμεσα με την PARN, και στο κυτταρόπλασμα, και στον πυρήνα, 2) η πολύ μεγάλη διαφορά που παρατηρείται στα επίπεδα του miR-29a μεταξύ πυρηνικού και κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος θα μπορούσε να σημαίνει πως: α) η PARN ρυθμίζει την ίδια της την έκφραση, πιθανόν μέσω ρύθμισης του miR-29a (του πιθανού ρυθμιστή της), και/ή ότι β) η PARN συμμετέχει με κάποιο τρόπο στην ωρίμανσή του, μέσω ρύθμισης των επιπέδων των πρόδρομων μορφών του miR-29a (pri-miR και pre-miR μορφών), οι οποίες αφθονούν στον πυρήνα (Σκουντέλνικ Ν. Διπλωματική εργασία 2013· Kyritsis et al, in preparation).

Συμπεράσματα-Προοπτικές

Συμπερασματικά, από τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα, διαφαίνεται μια σαφής εξάρτηση των miR-29a, miR-1207 από την PARN. Προκειμένου να είμαστε σε θέση να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα για τη δυναμική σχέση μεταξύ επιπέδων miRNA-PARN (και απαδενυλασών γενικότερα), μελλοντικές βλέψεις αποτελούν α) ο έλεγχος της στόχευσης του mRNA της PARN από τα miR-29a και miR-1207, β) η υποέκφραση/σίγηση των miR-29a και miR-1207 με τη χρήση αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων έναντι των δύο miRNAs και έλεγχο των επιπέδων της PARN, και γ) ο έλεγχος των επιπέδων των πρόδρομων μορφών pri- miR-29a και pri-miR-1207 με qRT-PCR, μετά από ανοσοκατακρήμιση RNA με αντίσωμα έναντι των δύο απαδενυλασών.

Με δεδομένα α) το ρόλο των διαταραγμένων επιπέδων των microRNAs (όπως το miR-29a) και των απαδενυλασών (όπως η PARN) στον καρκίνο, β) της ενορχηστρωμένης δράσης microRNA – απαδενυλασών για στόχευση συγκεκριμένων mRNAs, και γ) την

απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε ασθένειες όπως ο καρκίνος, τα παραπάνω αποτελέσματα προσθέτουν νέα γνώση στη σημασία των microRNA και των απαδενυλασών και του ρόλου τους στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΛΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ambros et al. (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9: 277-279

Balatsos NA, Maragozidis P, Anastasakis D, Stathopoulos C. (2012). Modulation of poly(A)-specific ribonuclease (PARN): current knowledge and perspectives. *Curr Med Chem* 19:4838–49.

Bartel, DP. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116: 281-297

Bartel, DP. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 136: 215-233

Bass, B.L. (2002). RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 817-846.

Behm-Ansmant, I., J. Rehwinkel, T. Doerks, A. Stark, P. Bork and E. Izaurralde. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* 20: 1885-1898.

Berndt, H., Harnisch, C., Rammelt, C., Stöhr, N., Zirkel, A., Dohm, J. C., ... Wahle, E. (2012). Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *RNA (CSHLP)*, 18(5), 958–72.

Bernstein P, Peltz SW, Ross J. (1989). The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Mol Cell Biol* 9:659–70.

Blenkiron, C., L.D. Goldstein, N.P. Thorne, I. Spiteri, S.F. Chin, M.J. Dunning, N.L. Barbosa-Morais, A.E. Teschendorff, A.R. Green, I.O. Ellis, S. Tavaré, C. Caldas and E.A. Miska. (2007). MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol.* 8: R214.

Bogerd, H. P., Karnowski, H. W., Cai, X., Shin, J., Pohlers, M., & Cullen, B. R. (2010). A Mammalian Herpesvirus Uses Noncanonical Expression and Processing Mechanisms to Generate Viral MicroRNAs. *Molecular Cell*, 37(1), 135–142.

Bosse, G. D., Rüegger, S., Ow, M. C., Vasquez-rifo, A., Evelyne, L., Ambros, V. R., ... Simard, M. J. (2013). The Decapping Scavenger enzyme DCS-1 controls microRNA levels in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Cell*, 50(2), 281–287.

- Brameier, M., Herwig, A., Reinhardt, R., Walter, L., & Gruber, J. (2011).** Human box C/D snoRNAs with miRNA like functions: Expanding the range of regulatory RNAs. *Nucleic Acids Research*, 39(2), 675–686.
- Brennecke, J., A. Stark, R.B. Russell and S.M. Cohen. (2005).** Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 3: e85.
- Cai, X., C.H. Hagedorn and B.R. Cullen. (2004).** Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10: 1957-1966
- Calin, G. A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., & Wojcik, S. E. (2005).** A MicroRNA Signature Associated with Prognosis and Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*, 353(17), 1793–1801.
- Calin, G.A. and C.M. Croce. (2006a).** MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev.Cancer* 6: 857-866.
- Calin, G.A. and C.M. Croce. (2006b).** MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. *Oncogene* 25: 6202-6210.
- Calin, G.A., C. Sevignani, C.D. Dumitru, T. Hyslop, E. Noch, S. Yendamuri, M. Shimizu, S. Rattan, F. Bullrich, M. Negrini and C.M. Croce. (2004b).** Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101: 2999-3004.
- Calin, G.A., C.D. Dumitru, et al. (2002).** Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99: 15524-15529.
- Calin, G.A., C.G. Liu, et al. (2004a).** MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11755-11760.
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009).** Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642–655.
- Cevher MA, Zhang X, Fernandez S, et al. (2010).** Nuclear deadenylation/polyadenylation factors regulate 3' processing in response to DNA damage. *EMBO J* 29:1674–87.
- Chang Tsung-Cheng, Yu Duonan, Lee Yun-Sil, Wentzel A Erik, Arking E Dan, West M. Kristin et al. (2008)** Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nature Genetics* 40, 43 – 50
- Cheloufi , S., C.O. Dos Santos, M.M. Chong and G.J. Hannon. (2010).** A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465: 584-589.

- Chen C.Y. & Shyu, A.B. (2003)** Rapid deadenylation triggered by a nonsense codon precedes decay of the RNA body in a mammalian cytoplasmic nonsense-mediated decay pathway. *Mol. Cell Biol.* 23: 4805–4813
- Chen, C.Z. (2005).** MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N. Engl. J. Med.* 353: 1768-1771.
- Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., & Zhang, C. Y. (2012).** Secreted microRNAs: A new form of intercellular communication. *Trends in Cell Biology*, 22(3), 125–132.
- Chen, X., Y. Ba, et al. (2008).** Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 18: 997-1006.
- Chiba, Y., Johnson, M. A., Lidder, P., Vogel, J. T., Van Erp, H., & Green, P. J. (2004).** AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in Arabidopsis. *Gene*, 328(1-2), 95–102.
- Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D. W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., ..., Giraldez, A. J. (2010)** A Novel miRNA Processing Pathway Independent of Dicer Requires Argonaute2 Catalytic Activity. *Science*, 328(5986), 1694–1698.
- Cimmino, A., G.A. Calin, et al. (2005).** miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102: 13944-13949.
- Cocucci, E. et al. (2009)** Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 19, 43–51
- Cole, C., Sobala, A., Lu, C., Thatcher, S. R., Bowman, A., Brown, J. W. S., ... Hutvagner, G. (2009)** Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs. *Rna*, 15(12), 2147–2160.
- Conrad N.K., Shu M.D., Uyhazi K.E. & Steitz J.A. (2007)** Mutational analysis of a viral RNA element that counteracts rapid RNA decay by interaction with the polyadenylate tail. *Proc. Natl Acad. Sci.* 104: 10412–10417
- Copeland PR, Wormington M. (2001).** The mechanism and regulation of deadenylation: identification and characterization of Xenopus PARN. *RNA* 7:875–86.
- Copeland PR, Wormington M. (2001).** The mechanism and regulation of deadenylation: identification and characterization of Xenopus PARN. *RNA* 7:875–86.
- Cortez, M.A. and G.A. Calin. (2009).** MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 9: 703-711.
- Das, S. K., Sokhi, U. K., Bhutia, S. K., Azab, B., Su, Z.-Z., Sarkar, D., & Fisher, P. B. (2010).** Human polynucleotide phosphorylase selectively and preferentially degrades microRNA-221 in human melanoma cells. *PNAS*, 107(26), 11948–53.

- Dehlin E, Wormington M, Korner CG, Wahle E. (2000).** Cap-dependent deadenylation of mRNA. *Embo J* 19:1079–86.
- Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack. (2006).** Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6: 259-269.
- Eulalio A., Behm-Ansmant I. & Izaurralde E. (2007)** P bodies: at the crossroads of posttranscriptional pathways. *Mol. Biol. Cell.* 8: 9–22
- Eulalio Ana et al. (2007).** P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(1):9-22.
- Felli, N., L. Fontana, et al. (2005).** MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102: 18081-18086.
- Ford LP, Watson J, Keene JD, Wilusz J. (1999).** ELAV proteins stabilize deadenylated intermediates in a novel in vitro mRNA deadenylation degradation system. *Genes Dev* 13:188–201.
- Ford LP, Wilusz J. (1999).** An in vitro system using HeLa cytoplasmic extracts that reproduces regulated mRNA stability. *Methods* 17:21–7.
- Gao M, Fritz DT, Ford LP, Wilusz J. (2000).** Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 50 cap influences mRNA deadenylation rates in vitro. *Mol Cell* 5:479–88.
- Garneau, N., Wilusz, J. & Wilusz, C. (2007).** The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 113–126
- Garzon, R., Marcucci, G. & Croce, C. M. (2010)** Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nature Rev. Drug Discov.* 9, 775–789
- Gilad, S., E. Meiri, et al. (2008).** Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 3: e3148.
- Goldstrohm, A. C., & Wickens, M. (2008).** Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(4), 337–344.
- Green, C. B., Douris, N., Kojima, S., Strayer, C. A., Fogerty, J., Lourim, D., ... Besharse, J. C. (2007).** Loss of Nocturnin, a circadian deadenylase, confers resistance to hepatic steatosis and diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(23), 9888–93.
- Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. (2007).** MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell.* 27: 91-105

- Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, Bartel DP. (2007)** MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell.* 27: 91-105
- Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M. F., Feldser, D., ... Lander, E. S. (2009).** Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*, 458(7235), 223–7.
- Ha, M. and Kim, V. N. (2014)** Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 509–524
- Hammet, A., Pike, B.L. & Heierhorst, J. (2002).** Posttranscriptional regulation of the *RAD5* DNA repair gene by the dun1 kinase and the Pan2-Pan3 poly(A)-nuclease complex contributes to survival of replication blocks. *J. Biol. Chem.* 277: 22469–22474
- Han, J., Y. Lee, K.H. Yeom, Y.K. Kim, H. Jin and V.N. Kim. (2004).** The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 18: 3016-3027.
- Hanke, M., K. Hoefig, H. Merz, A.C. Feller, I. Kausch, D. Jocham, J.M. Warnecke and G. Sczakiel. (2010).** A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol. Oncol.* 28: 655-661.
- Harwig, A., Herrera-Carrillo, E., Jongejan, A., van Kampen, A. H., & Berkhout, B. (2015).** Deep Sequence Analysis of AgoRNA Processing Reveals 3' A Addition and Trimming. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 4(January), 1–8.
- Hayes, J., Peruzzi, P. P., & Lawler, S. (2014).** MicroRNAs in cancer: Biomarkers, functions and therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 20(8), 460–469.
- He, H., K. Jazdzewski, W. Li, S. Liyanarachchi, R. Nagy, S. Volinia, G.A. Calin, C.G. Liu, K. Franssila, S. Suster, R.T. Kloos, C.M. Croce and A. de la Chapelle. (2005a).** The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102: 19075-19080.
- He, L., J.M. Thomson, M.T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S.W. Lowe, G.J. Hannon and S.M. Hammond. (2005b).** A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435: 828-833.
- He, X.Y., J.X. Chen, Z. Zhang, C.L. Li, Q.L. Peng and H.M. Peng. (2010).** The let-7a microRNA protects from growth of lung carcinoma by suppression of k-Ras and c-Myc in nude mice. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 136: 1023-1028.

- Ho, A.S., X. Huang, H. Cao, C. Christman-Skieller, K. Bennewith, Q.T. Le and A.C. Koong. (2010).** Circulating miR-210 as a Novel Hypoxia Marker in Pancreatic Cancer. *Transl. Oncol.* 3: 109-113.
- Hook, B., Goldstrohm, A. C., Seay, D. J. & Wickens, M. (2007)** Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. *J. Biol. Chem.* 282: 15430–15438
- Huang, Z., D. Huang, S. Ni, Z. Peng, W. Sheng and X. Du. (2010).** Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 127: 118-126.
- Iorio, V. M. and Croce M. C. (2009).** MicroRNAs in Cancer: Small Molecules With a Huge Impact, *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY* , DOI: 10.1200/JCO.2009.24.0317
- Jiang, H., Zhang, G., Zhang, G., Wu, J. H., & Jiang, C. P. (2014).** Diverse roles of miR-29 in cancer (Review). *Oncology Reports*, 31(4), 1509–1516.
- Johnson, S.M., H. Grosshans, J. Shingara, M. Byrom, R. Jarvis, A. Cheng, E. Labourier, K.L. Reinert, D. Brown and F.J. Slack. (2005).** RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120: 635-647
- Kadyrova, L. Y., Habara, Y., Lee, T. H., & Wharton, R. P. (2007).** Translational control of maternal cyclin B mRNA by nanos in the Drosophila germline. *Development* 134: 1519–1527
- Katoh, T., Hojo, H., & Suzuki, T. (2015).** Destabilization of microRNAs in human cells by 3' deadenylation mediated by PARN and CUGBP1. *Nucleic Acids Research*, 43(15), 7521–7534.
- Kim JH, Richter JD. (2007).** RINGO/cdk1 and CPEB mediate poly(A) tail stabilization and translational regulation by ePAB. *Genes Dev* 21:2571–9.
- Kim, U., Y. Wang, T. Sanford, Y. Zeng and K. Nishikura. (1994).** Molecular cloning of cDNA for double-stranded RNA adenosine deaminase, a candidate enzyme for nuclear RNA editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91: 11457-11461.
- Kim, V.N. (2005).** MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev.Mol. Cell Biol.* 6: 376-385.
- Kim, W. C., & Lee, C. H. (2009).** The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1796(2), 99–113.
- Korner CG, Wormington M, Muckenthaler M, et al. (1998).** The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Embo J* 17:5427–37.

- Korner, C. G., Wormington, M., Muckenthaler, M., Schneider, S., Dehlin, E., & Wahle, E. (1998).** The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO Journal*, 17(18), 5427–5437.
- Kosaka, N. et al. (2010)** Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J. Biol. Chem.* 285, 17442–17452
- Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010).** The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews. Genetics*, 11(9), 597–610.
- Krutovsikh, V.A. and Z. Herceg. (2010).** Oncogenic microRNAs (OncomiRs) as a new class of cancer biomarkers. *Bioessays* 32: 894-904.
- Kuzuoglu-Ozturk et al. (2012).** The *Caenorhabditis elegans* GW182 protein AIN-1 interacts with PAB-1 and subunits of the PAN2-PAN3 and CCR4-NOT deadenylase complexes. *Nucleic Acids Research*, 2012, Vol. 40, No. 12 5651–5665
- Lai WS, Carballo E, Strum JR, et al. (1999).** Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Mol Cell Biol* 19:4311–23.
- Lai WS, Carballo E, Thorn JM, et al. (2000).** Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA. Binding of tristetraprolin-related zinc finger proteins to Au-rich elements and destabilization of mRNA. *J Biol Chem* 275:17827–37.
- Lai WS, Kennington EA, Blackshear PJ. (2003).** Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. *Mol Cell Biol* 23:3798–812
- Lanza, G., M. Ferracin, R. Gafa, A. Veronese, R. Spizzo, F. Pichiorri, C.G. Liu, G.A. Calin, C.M. Croce and M. Negrini. (2007).** mRNA/microRNA gene expression profile in microsatellite unstable colorectal cancer. *Mol. Cancer* 6: 54.
- Lawrie, C.H. et al. (2008)** Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 141, 672–675
- Lebanony, D., H. Benjamin, et al. (2009).** Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 27: 2030-2037.
- Lee, K., N. Kunkeaw, S.H. Jeon, I. Lee, B.H. Johnson, G.Y. Kang, J.Y. Bang, H.S. Park, C. Leelayuwat and Y.S. Lee. (2011).** Precursor miR-886, a novel noncoding RNA repressed in cancer, associates with PKR and modulates its activity. *RNA* 17: 1076-1089.
- Lee, Y., K. Jeon, J.T. Lee, S. Kim and V.N. Kim. (2002).** MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO* 21: 4663-4670.

- Lee, Y.S., H.K. Kim, S. Chung, K.S. Kim and A. Dutta. (2005).** Depletion of human micro-RNA miR-125b reveals that it is critical for the proliferation of differentiated cells but not for the down-regulation of putative targets during differentiation. *Biol. Chem.* 280: 16635-16641.
- Lejeune F., Li, X. & Maquat, L. E. (2003)** Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Mol. Cell.* 12: 675–687
- Lewin,** Genes VIII, ISBN SET 960-88412-0-8
- Lu, J., G. Getz, et al. (2005).** MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435: 834-838.
- Lujambio, A., & Lowe, W. S. (2012).** The microcosmos of cancer. *Nature*, 482(7385), 347–355.
- Lujambio, A., S. Ropero, et al. (2007).** Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* 67: 1424-1429.
- Lund, E., S. Guttinger, A. Calado, J.E. Dahlberg and U. Kutay. (2004).** Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303: 95-98.
- Maragozidis P, Karangeli M, Labrou M, et al. (2012).** Alterations of deadenylase expression in acute leukemias: evidence for poly(a)- specific ribonuclease as a potential biomarker. *Acta Haematol* 128:39–46.
- Maragozidis P, Papanastasi E, Scutelnic D, Totomi A, Kokkori I, Zarogiannis SG, Kerenidi T, Gourgoulialis KI, Balatsos NA. (2015)** Poly(A)-specific ribonuclease and Nocturnin in squamous cell lung cancer: prognostic value and impact on gene expression. *Mol Cancer.* Nov 5;14(1):187.
- Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N, Burley SK. (1997).** Cocystal structure of the messenger RNA 50 cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* 89:951–61.
- Martinez J, Ren YG, Nilsson P, et al. (2001).** The mRNA cap structure stimulates rate of poly(A) removal and amplifies processivity of degradation. *J Biol Chem* 276:27923–9.
- Martinez J, Ren YG, Thuresson AC, et al. (2000).** A 54-kDa fragment of the poly(A)-specific ribonuclease is an oligomeric, processive, and cap-interacting poly(A)-specific 30 exonuclease. *J Biol Chem* 275:24222–30
- Mashima, T., Kudo, M., Takada, Y., Matsugami, A., Gopinath, S. C. B., Kumar, P. K. R., & Katahira, M. (2008).** Interactions between antitumor drugs and vault RNA. *Nucleic Acids Symposium Series*, (52), 217–218.

- Mathivanan, S. et al. (2010)** Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteomics* 73, 1907–1920
- Mattick, J. S. (2009).** The genetic signatures of noncoding RNAs. *PLoS Genetics*, 5(4), e1000459.
- Mattie, M.D., C.C. Benz, J. Bowers, K. Sensinger, L. Wong, G.K. Scott, V. Fedele, D. Ginzinger, R. Getts and C. Haqq. (2006).** Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol. Cancer* 5: 24.
- Mayr, C., Hemann, M. T. & Bartel, D. P. (2007).** Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* 315, 1576–1579.
- McIntyre, A., B. Summersgill, et al. (2005).** Amplification and overexpression of the KIT gene is associated with progression in the seminoma subtype of testicular germ cell tumors of adolescents and adults. *Cancer Res.* 65: 8085-8089.
- Mitchell, P. & Tollervey, D. (2001).** mRNA turnover. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 320–325
- Mitchell, P.S. et al. (2008)** Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 10513–10518
- Miyoshi, K., T. Miyoshi and H. Siomi. (2010).** Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Mol. Genet. Genomics* 284: 95-103.
- Monecke T, Schell S, Dickmanns A, Ficner R. (2008).** Crystal structure of the RRM domain of poly(A)-specific ribonuclease reveals a novel m(7)G-cap-binding mode. *J Mol Biol* 382:827–34.
- Nagata T, Suzuki S, Endo R, et al. (2008).** The RRM domain of poly(A)-specific ribonuclease has a noncanonical binding site for mRNA cap analog recognition. *Nucleic Acids Res* 36:4754–67.
- Niedzwiecka A, Lekka M, Nilsson P, Virtanen A. (2011).** Global architecture of human poly(A)-specific ribonuclease by atomic force microscopy in liquid and dynamic light scattering. *Biophys Chem* 158:141–9
- Nilsson P, Henriksson N, Niedzwiecka A, et al. (2007).** A multifunctional RNA recognition motif in poly(A)-specific ribonuclease with cap and poly(A) binding properties. *J Biol Chem* 282:32902–11.
- Nissen, P. (2000).** The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis. *Science*, 289(5481), 920–930.

- Nossal NG, Singer MF. (1968).** The processive degradation of individual polyribonucleotide chains. I. Escherichia coli ribonuclease II. *J Biol Chem* 243:913–22.
- Novina, C. D., & Sharp, P. A. (2004).** The RNAi revolution. *Nature*, 430(6996), 161–164.
- Nowsheen, Somaira et al. (2011)** Molecular markers for cancer prognosis and treatment: Have we struck gold? *Cancer Letters* , Volume 327 , Issue 1 , 142 – 152
- O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V. & Mendell, J. T. (2005)** c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435, 839–843.
- Okamura, K., Hagen, J. W., Duan, H., Tyler, D. M., & Lai, E. C. (2007).** The Mirtron Pathway Generates microRNA-Class Regulatory RNAs in Drosophila. *Cell*, 130(1), 89–100.
- Park, N.J. et al. (2009a)** Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin. Cancer Res.* 15,5473–5477
- Park, S.Y., J.H. Lee, M. Ha, J.W. Nam and V.N. Kim. (2009b).** miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16: 23-29.
- Parker R, Song H. (2004).** The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 11:121–7.
- Peterson, S. M., Thompson, J. A., Ufkin, M. L., Sathyanarayana, P., Liaw, L., & Congdon, C. B. (2014).** Common features of microRNA target prediction tools. *Frontiers in Genetics*, 5(FEB), 1–10.
- Pineau, P., S. Volinia, K. McJunkin, A. Marchio, C. Battiston, B. Terris, V. Mazzaferro, S.W. Lowe, C.M. Croce and A. Dejean. (2010).** miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107: 264-269.
- Ponting, C. P., Oliver, P. L., & Reik, W. (2009).** Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. *Cell*, 136(4), 629–641.
- Ramachandran, V., & Chen, X. (2008)** Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5895), 1490–1492.
- Ratajczak, J. et al. (2006)** Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 20,847–856
- Reinhardt HC, Hsaskamp P, Schmedding I, et al. (2010).** DNA damage activates a spatially distinct late cytoplasmic cell-cycle checkpoint network controlled by MK2-mediated RNA stabilization. *Mol Cell* 40:34–49

- Ren, Y. G., Kirsebom, L. A., & Virtanen, A. (2004).** Coordination of divalent metal ions in the active site of poly(A)-specific ribonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 48702–48706.
- Ren, Y. G., Martínez, J., & Virtanen, A. (2002).** Identification of the active site of poly(A)-specific ribonuclease by site-directed mutagenesis and Fe²⁺-mediated cleavage. *Journal of Biological Chemistry*, 277(8), 5982–5987.
- Resnick, K.E., H. Alder, J.P. Hagan, D.L. Richardson, C.M. Croce and D.E. Cohn. (2009).** The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol. Oncol.* 112: 55-59.
- Reverdatto, S. V, Dutko, J. a, Chekanova, J. a, Hamilton, D. a, & Belostotsky, D. a. (2004).** mRNA deadenylation by PARN is essential for embryogenesis in higher plants. *Rna*, 10(8), 1200–1214.
- Rosenfeld, N., R. Aharonov, et al. (2008).** MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat. Biotechnol.* 26: 462-469.
- Ross J. (1995).** mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev* 59:423–50.
- Ruby, J.G., C.H. Jan and D.P. Bartel. (2007).** Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448: 83-86.
- Saito, Y. et al. (2006).** Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene *BCL6* by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 9, 435–443.
- Schepeler, T., J.T. Reinert, M.S. Ostefeld, L.L. Christensen, A.N. Silahtaroglu, L. Dyrskjot, C. Wiuf, F.J. Sorensen, M. Kruhoffer, S. Laurberg, S. Kauppinen, T.F. Orntoft and C.L. Andersen. (2008).** Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. *Cancer Res.* 68: 6416-6424.
- Schoenberg DR, Maquat LE. (2012).** Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet* 13:246–59
- Schwarz, D.S., Y. Tomari and P.D. Zamore. (2004).** The RNA-induced silencing complex is a Mg²⁺-dependent endonuclease. *Curr. Biol.* 14: 787-791.
- Slack, F.J. and J.B. Weidhaas. (2006).** MicroRNAs as a potential magic bullet in cancer. *Future Oncol.* 2: 73-82.
- Taft, R. J., Glazov, E. A., Lassmann, T., Hayashizaki, Y., Carninci, P., & Mattick, J. S. (2009).** Small RNAs derived from snoRNAs. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(7), 1233–40.
- Takamizawa, J., H. Konishi, K. Yanagisawa, S. Tomida, H. Osada, H. Endoh, T. Harano, Y.**

- Yatabe, M. Nagino, Y. Nimura, T. Mitsudomi and T. Takahashi. (2004).** Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 64: 3753-3756.
- Tanaka, H., K. Kato, E. Yamashita, T. Sumizawa, Y. Zhou, M. Yao, K. Iwasaki, M. Yoshimura and T. Tsukihara. (2009).** The structure of rat liver vault at 3.5 angstrom resolution. *Science* 323: 384-388.
- Tang, F., P. Hajkova, S.C. Barton, K. Lao and M.A. Surani. (2006).** MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 34: e9.
- Thery, C. et al. (2002)** Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 569–579
- Tsang, J.C. and Y.M. Lo. (2007).** Circulating nucleic acids in plasma/serum. *Pathology* 39: 197-207.
- Tucker, M., Valencia-Sanchez, M. A., Staples, R. R., Chen, J., Denis, C. L., & Parker, R. (2001).** The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 104(3), 377–386.
- Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, et al. (2010).** Towards a knowledgebased human protein atlas. *Nat Biotechnol* 28:1248–50.
- Vella, M.C., E.Y. Choi, S.Y. Lin, K. Reinert and F.J. Slack. (2004).** The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. *Genes Dev.* 18: 132-137.
- Veronese, A. et al. (2011).** Mutated β -catenin evades a microRNA-dependent regulatory loop. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108, 4840–4845.
- Virtanen, A., Henriksson, N., Nilsson, P., & Nissbeck, M. (2013).** Poly(A)-specific ribonuclease (PARN): An allosterically regulated, processive and mRNA cap-interacting deadenylase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 48(2), 192–209.
- Voinnet, O. (2009).** Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136: 669-687.
- Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C.-G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., ... Croce, C. M. (2006).** A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2257–2261.
- Waldman, S.A. and A. Terzic. (2007).** Translating MicroRNA discovery into clinical biomarkers in cancer. *JAMA* 297: 1923-1925.

- Wang, K., S. Zhang, B. Marzolf, P. Troisch, A. Brightman, Z. Hu, L.E. Hood and D.J. Galas. (2009).** Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106: 4402-4407.
- Wilusz CJ, Wormington M, Peltz SW. (2001)** The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:237–46.
- Wilusz, J. E., Sunwoo, H., & Spector, D. L. (2009).** Long noncoding RNAs : functional surprises from the RNA world Long noncoding RNAs : functional surprises from the RNA world. *GENES & DEVELOPMENT*, 23, 1494–1504.
- Wilusz, J.E., H. Sunwoo and D.L. Spector. (2009)** Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev.* 23: 1494-1504.
- Wormington M, Searfoss AM, Hurney CA. (1996).** Overexpression of poly(A) binding protein prevents maturation-specific deadenylation and translational inactivation in *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 15:900–9.
- Wu, G., Liu, A., Zhu, J., Lei, F., Wu, S., Zhang, X., ... He, S. (2015).** MiR-1207 overexpression promotes cancer stem cell–like traits in ovarian cancer by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncotarget*, 6(30), 28882–28894.
- Wu, L., Fan, J., & Belasco, J. G. (2006).** MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(11), 4034–4039.
- Wu, M., Reuter, M., Lilie, H., Liu, Y., Wahle, E., & Song, H. (2005).** Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *The EMBO Journal*, 24(23), 4082–93.
- Wu, X., & Brewer, G. (2012).** The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. *Gene*, 500(1), 10–21.
- Yamashita A, Chang TC, Yamashita Y, Zhu W, Zhong Z, Chen CY, Shyu AB (2005).** Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1054–1063.
- Yamashita A, Chang TC, Yamashita Y, Zhu W, Zhong Z, Chen CY, Shyu AB (2005).** Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1054–1063.
- Yanaihara, N. et al. (2006)** Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9, 189–198

- Yang, J. S., Smibert, P., Westholm, J. O., Jee, D., Maurin, T., & Lai, E. C. (2014).** Intertwined pathways for Argonaute-mediated microRNA biogenesis in *Drosophila*. *Nucleic Acids Research*, 42(3), 1987–2002.
- Yang, J.-S., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K. D., Jeffrey, K. L., Chandwani, R. & Lai, E. C. (2010).** Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(34), 15163–15168.
- Yang, J.S., T. Maurin, N. Robine, K.D. Rasmussen, K.L. Jeffrey, R. Chandwani, E.P. Papapetrou, M. Sadelain, D. O’Carroll and E.C. Lai. (2010).** Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107: 15163-15168
- Yi, R., Y. Qin, I.G. Macara and B.R. Cullen. (2003).** Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17: 3011-3016.
- Yoda, M., Cifuentes, D., Izumi, N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Giraldez, A. J., & Tomari, Y. (2013).** Poly(A)-specific ribonuclease mediates 3'-end trimming of argonaute2-cleaved precursor microRNAs. *Cell Reports*, 5(3), 715–726.
- Zhang, L., J. Huang, et al. (2006).** microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103: 9136-9141.
- Zhang A, Liu WF, Yan YB. (2007).** Role of the RRM domain in the activity, structure and stability of poly(A)-specific ribonuclease. *Arch Biochem Biophys* 461:255–62.
- Zhang X, Virtanen A, Kleiman FE. (2010).** To polyadenylate or to deadenylate: that is the question. *Cell Cycle* 9:4437–49.
- Zhang, X., Devany, E., Murphy, M. R., Glazman, G., Persaud, M., & Kleiman, F. E. (2015a).** PARN deadenylase is involved in miRNA-dependent degradation of TP53 mRNA in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 43(22), 10925–10938.
- Zhang, L. N., & Yan, Y. Bin. (2015b).** Depletion of poly(A)-specific ribonuclease (PARN) inhibits proliferation of human gastric cancer cells by blocking cell cycle progression. *Biochimica et Biophysica Acta* 1853(2), 522–534.
- Zhu Y, Chen G, Lv F, et al. (2011).** Zinc-finger antiviral protein inhibits HIV-1 infection by selectively targeting multiply spliced viral mRNAs for degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 15834–9.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ

Σκουτέλνικ Ν. “Μελέτες στο συσχετισμό απαδενυλασών και microRNAs στην αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs”, Διατριβή (μεταπτυχιακή), Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, 2013.

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

[https://en.wikipedia.org/wiki/Biomarker_\(medicine\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Biomarker_(medicine)) - προσπέλαση 30/05/2016

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Βακτηριακά κύτταρα

XL1-BLUE (Stratagene)

Πλασμίδια

pET-33b

pcDNA4/TO (Life Technologies)

Θρεπτικά υλικά

LB Broth Scharlau

LB Agar Scharlau

RPMI, 10% FBS, 1% Antibiotic-antimycotic για τα κύτταρα θηλαστικών NCI-H520

Χημικά και διαλύματα

TAE 50x: Tris base 24,2% v/w, ακετοξικό οξύ 5,71% w/w, EDTA 0,05M, pH 8,6

Loading buffer 6x: Bromophenol Blue 0,09%, Xylene Cyanol 0,09%, Γλυκερόλη 60%, EDTA 60mM

Αγαρόζη (Sigma)

DNA μοριακός μάρτυρας 1Kb (thermoScientific)

Midori Green DNA stain (Nippon Genetics)

Bromophenol blue (Rasearch Organics)

Xylene Cyanol (Merck)

Γλυκερόλη (Panreac)

Tris (Merck)

Ακετοξικό οξύ (Merck)

PBS 1x (Phosphate Buffer Salts): 137mM NaCl, 2.7mm KCl, 4.3mM Na₂HPO₄, 1.47mM KH₂PO₄

RPMI (Biosera)

FBS (Biosera)

Antibiotic-antimycotic (Gibco)

DMSO (Sigma)

Τρυψίνη (Biosera)

EDTA (Merck)

NaCl (Merck)
KCl (Merck)
Na₂HPO₄ (Merck)
KH₂PO₄ (Merck)
Αιθανόλη (Sigma)
Neubauer (Poly Optik GmbH)
Running buffer 10x: 25mM Tris, 192mM Glycine, SDS 0,1%, 500 ml dH₂O
Transfer buffer 1x: 10% running buffer 10x, 10% Methanol (100%), dH₂O
Blocking buffer: 0,1% Tween, 5% γάλα, PBS 1x
Washing buffer (PBS-T): 0,1% Tween, PBS 1x
Protein Loading Buffer 4x: 1M Tris pH 6.8, 10% glycerol, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% bromophenol blue
Acryl-bisacrylamide mix (Merck)
Tris (Merck)
SDS (Merck)
APS (Merck)
TEMED (Life Invitrogen)
Glycerol (Merck)
β-μερκαπτοαιθανόλη (Merck)
Glycine (Merck)
Bromophenol blue (Rasearch Organics)
Methanol (Merck)
Γάλα σε σκόνη (Regilait)
Ponceau Red (Sigma)
PARN (H-105) - Rabbit polyclonal antibody IgG (Santa Cruz Biotechnology)
Goat anti-rabbit IgG-HRP (thermoScientific)
ECL Plus (Amersham)
Protein ladder (Nippon Genetics)
Bovine Serum Albumin (BSA) (New England Biolabs)
Tween-20 (BioChemica)

Kits

KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit (KAPA BIOSYSTEMS)

DpnI (New England Biolabs)

NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kit (Macherey-Nagel)

In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech)

EcoRI (Clontech)

X-fect transfection reagent (Clontech)

TRIzol reagent kit (Sigma)

Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis kit (Clontech)

KAPA-SYBR® FAST qPCR kit (KAPA BIOSYSTEMS)

miNucleoSpin® miRNA kit (Macherey-Nagel)

T-REx Σύστημα (Life Technologies)